

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz)
des Fachbereichs Medizin der Philipps Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**„IN VITRO ZELLKULTUR STUDIE ÜBER DIE SIGNIFIKANZ VON BONE
MORPHOGENETIC PROTEIN-2 (BMP-2) IM PROZESS DER KNOCHEN-
SEHNEN-INTEGRATION“**

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der
Philipps Universität Marburg



vorgelegt von
Moritz Crönlein
aus Darmstadt

Marburg 2012

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps Universität Marburg, am: 19.07.2012
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas M. Frangen
1. Korreferent: Prof. Dr. med. Markus Schofer

WIDMUNG

meinem Opa gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	6
1.1	Verletzung des vorderen Kreuzbandes.....	6
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	6
1.1.2	<i>Prinzip des VKB-Ersatzes</i>	7
1.1.3	<i>Problematik</i>	8
1.2	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	11
1.2.1	<i>Entdeckung und Struktur</i>	11
1.2.2	<i>Rezeptoren und Signaltransduktion</i>	13
1.2.3	<i>Antagonisten der BMPs</i>	16
1.2.4	<i>Funktion der BMPs</i>	17
1.2.5	<i>Einsatzgebiete der BMPs in der Medizin</i>	18
1.3	Beteiligte Zelllinien und Gewebe in Zellkultur und Kreuzbandchirurgie.....	19
1.3.1	<i>Histologischer Aufbau von Sehnen</i>	19
1.3.2	<i>Ultrastruktur des Knochens</i>	20
1.4	Fragestellung und Grundüberlegung:.....	23
2	Material.....	25
2.1	Laborgeräte und Instrumente.....	25
2.2	Chemikalien.....	26
2.3	Puffer.....	30
2.4	Kulturmedium.....	30
2.5	Test-Kits.....	30
2.6	Verbrauchsmaterialien.....	32
3	Methodik.....	33
3.1	Grundüberlegungen zum Versuchsaufbau.....	33
3.2	Präparation und Aufbereitung von bovinem Periost und von bovinen Sehnen.....	35
3.2.1	<i>Kultivierung von POBs</i>	35
3.3	Aussaat von POB und Fixierung von bovinen Sehnen.....	36
3.3.1	<i>Zellzählung von POB und Aussaat</i>	36
3.3.2	<i>Fibrinfixierung boviner Sehnen</i>	36
3.3.3	<i>Zellkulturbedingungen</i>	37
3.3.4	<i>Zellkulturversorgung</i>	37
3.4	Analytbestimmung aus Medienüberständen.....	38
3.4.1	<i>Probenentnahme und Lagerung</i>	38
3.4.2	<i>Bestimmung der Analyte</i>	38
3.5	Analytbestimmung der Lyse.....	40
3.5.1	<i>Probenentnahme</i>	40
3.5.2	<i>Aufbereitung</i>	41
3.5.3	<i>Bestimmung der Analyte</i>	41
3.6	Histologie.....	41
3.6.1	<i>Probenentnahme</i>	41
3.6.2	<i>Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen zur histologischen Präparatgewinnung</i>	41
3.6.3	<i>Einbettung</i>	42
3.6.4	<i>Herstellung von histologischen Schnitten</i>	43
3.6.5	<i>Färbung von histologischen Schnitten</i>	43
3.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	46
3.7.1	<i>Probenentnahme</i>	46
3.7.2	<i>Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen zur rasterelektronenmikroskopischen Präparatgewinnung</i>	46
3.7.3	<i>Critical Point Kammer (CPK)</i>	47
3.7.4	<i>Sputter Coater</i>	47
3.7.5	<i>Erstellen von rasterelektronenmikroskopischen Bildern</i>	47
3.8	Zusatzversuch.....	48

INHALTSVERZEICHNIS

3.8.1	<i>Grundzüge des Versuchs</i>	48
3.8.2	<i>Aufbereitung und Lyse</i>	48
3.8.3	<i>Bestimmung von alkalischer Phosphatase</i>	49
3.8.4	<i>Bestimmung von Analyten aus Medienüberständen</i>	49
3.9	Statistik.....	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Analytbestimmung Hauptversuch	50
4.1.1	<i>Analyte aus Medienüberständen</i>	50
4.1.2	<i>Analyte aus Lyse:</i>	60
4.2	Histologie und Rasterelektronenmikroskopie (REM)	62
4.2.1	<i>Histologie</i>	62
4.2.2	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM):</i>	75
4.3	Analytbestimmung Zusatzversuch	78
4.3.1	<i>Analyte aus Lyse</i>	78
4.3.2	<i>Analyte aus Medienüberständen</i>	81
5	Diskussion.....	83
5.1	allgemeine Beobachtungen	83
5.2	Zellkulturergebnisse im Vergleich	84
5.2.1	<i>Interpretation der Ergebnisse aus Analytbestimmungen</i>	84
5.2.2	<i>Interpretation der Ergebnisse aus Histologie</i>	89
5.2.3	<i>Interpretation der Ergebnisse aus REM</i>	91
5.3	Interpretation der Ergebnisse des Zusatzversuchs	92
5.4	Problematiken und Verbesserungen des Versuchsaufbaus.....	95
5.5	Ausblick	97
6	Zusammenfassung	99
7	Abstract.....	101
8	Literaturverzeichnis	103
9	Abbildungsverzeichnis	108
10	Abkürzungsverzeichnis.....	110
11	Anhang.....	111
11.1	Lebenslauf.....	111
11.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	113
11.3	Danksagung.....	115
11.4	ehrenwörtliche Erklärung.....	117

1 Einleitung

1.1 Verletzung des vorderen Kreuzbandes

1.1.1 Epidemiologie

Bandrupturen gehören zu den häufigsten Sportverletzungen weltweit. Sie sind schmerzhaft und stellen Patient und Arzt vor eine Reihe von Herausforderungen. Je nach Schwere der Verletzung und Art des betroffenen Gelenks kann zwischen konservativen und operativen Behandlungsstrategien gewählt werden.

Das Kniegelenk gehört in der Sportmedizin zu einer der häufigsten verletzten Körperregionen, wobei 18% aller Sportverletzungen des Mannes auf das Kniegelenk entfallen. Durch verschiedene Pathomechanismen im Zusammenhang mit direkter und indirekter Krafteinwirkung können unterschiedliche Strukturen des Knies geschädigt werden. (24)

An der Spitze, mit ca. 40%, liegen die ligamentären Verletzungen des Knies deutlich über Patella- bzw. Meniskusläsionen. Das vordere Kreuzband macht hierbei mit knapp 50% den größten Teil der Bandrupturen aus, wie in Abbildung 1 zu sehen ist. Läsionen des hinteren Kreuzbandes (4%) sind vergleichsweise selten. (6)

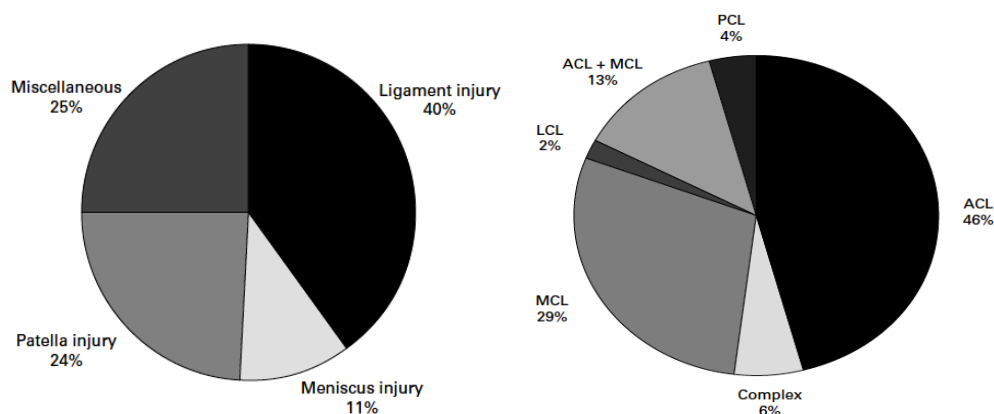


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung von Knieverletzungen

links: Klassifikation von 1833 Knieverletzungen, rechts: Klassifikation von 500 Knieverletzungen (ACL: anterior cruciate ligament, PCL: posterior cruciate ligament, MCL: medial collateral ligament, LCL: lateral collateral ligament), aus: (6)

EINLEITUNG

In den USA werden jährlich mehr als 200.000 VKB Rupturen diagnostiziert, von denen über 100.000 operativ versorgt werden.(65) In ca. 50 % der Fälle kann durch konservative Maßnahmen eine ausreichende Stabilisierung erzielt werden, die dem individuellen Anspruch des Patienten genüge trägt.(19, 39)

Zwar gelten die Ergebnisse der operativen VKB-Rekonstruktion gemeinhin als sehr gut (19), jedoch wird häufig vergessen, dass es mit der Operation alleine nicht getan ist. Die komplette Regeneration benötigt, trotz der „exzellenten“ Operationsergebnisse, immer noch sehr viel Zeit. So ist im Spitzensport, bei idealer Behandlung, ein Comeback meistens erst nach 6 Monaten möglich.

Um diesen vielseitigen Anforderungen begegnen zu können, ist es notwendig an der stetigen Verbesserung der Kreuzbandchirurgie zu arbeiten und durch Forschung in diesem Bereich, bestmögliche Ergebnisse für den Patienten zu erzielen.

1.1.2 Prinzip des VKB-Ersatzes

Die operative Versorgung der VKB-Ruptur hat sich in den letzten 30 Jahren ständig weiterentwickelt. Heutzutage hat sich die arthroskopische Operationstechnik weitestgehend durchgesetzt. Jedoch gibt es auch hier Unterschiede in der Art der gewählten Transplantate und in den unterschiedlichen Fixationstechniken.

Der Anspruch dieser Einleitung ist es nicht, alle Methoden und Mechanismen detailliert darzustellen, jedoch soll ein kleiner Überblick zum besseren Verständnis der späteren Überlegungen gegeben werden.

Eine grobe Unterteilung der verschiedenen Transplantate des vorderen Kreuzbandes lässt sich in Allografts und Autografts vornehmen. (4)

Allografts werden von Spendern gewonnen und in das Knie des Patienten transplantiert. Vorteile sind kürzere Operationszeiten, keine Entnahmemorbidität, geringere Inzidenz von Arthrofibrose und natürlich kosmetische Aspekte. Als Nachteile gelten das höhere Infektionsrisiko, schlechteres Einwachsverhalten, höhere Kosten und eine schlechtere Verfügbarkeit der Transplantate.(4) Die medizinische Weiterentwicklung in den letzten Jahren hat den Einsatz von Allografts zwar sicherer (geringere Infektionsraten etc.) gemacht, trotzdem finden sie immer seltenere Verwendung aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von Spendern. (3, 4)

EINLEITUNG

Unter Autografts versteht man Transplantate, die vom eigenen Körper des Patienten entnommen und anschließend als Bandersatz im Knie verwendet werden können. Zahlreiche verschiedene Sehnen kommen hierfür in Frage. Als mögliche Transplantate gelten: Lig. patellae, Sehnen des M. semitendinosus, M. gracilis, M. quadriceps femoris, M. plantaris oder auch der Tractus iliotibialis.

Am häufigsten werden die Sehne des M. semitendinosus und das Lig. patellae als Transplantate verwendet. Blagojevic et al. zeigten, dass beide Methoden hinsichtlich der Stabilität gleichwertig sind, Semitendinosus Grafts in der früheren Rehabilitationsphase jedoch Vorteile gegenüber dem Lig. patellae in Sachen Funktionalität und Schmerzen haben und daher bei jungen und sportlich aktiven Patienten zu bevorzugen sind. (5) (66) Operativ wird eine VKB-Ruptur heutzutage fast ausschließlich arthroskopisch versorgt. Ist die gewünschte Ersatzsehne entnommen, muss sie von Muskelgewebe befreit und anschließend genau auf die gewünschte Größe und Dicke zugeschnitten bzw. gefaltet und vernäht werden. Parallel dazu kann bereits mit der Arthroskopie des Kniegelenks begonnen werden. Zunächst werden der Gelenkraum gereinigt, die störenden Stümpfe des gerissenen Kreuzbandes entfernt und gegebenenfalls entzündete Synovialzotten mit dem Shaver abgetragen. Anschließend wird ein femoraler und ein tibialer Bohrkanaal angelegt. Nachdem das Bohrmehl durch abermaliges Spülen des Gelenks entfernt wurde, kann die Sehne mit einem Kirschner Draht als Führung in den Bohrtunnel eingebracht und darauffolgend fixiert werden.

Es gilt natürlich zu beachten, dass es sehr viele verschiedene Variationen dieser Operation gibt. Das Grundprinzip ist dabei aber das Gleiche.

Für diese Arbeit ist nur ein Grundverständnis erforderlich, da sie sich im Folgenden mit den Problemen der Knochen-Sehnen-Integration beschäftigen wird. (18)

1.1.3 Problematik

In der VKB-Chirurgie wurden in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte gemacht. Die operative Versorgung gilt heute, bei Verletzungen mit funktioneller Instabilität, als die Behandlung der Wahl um Spätfolgen, wie Arthrose, zu vermeiden. Nichtsdestotrotz kommt es postoperativ bei 0,7-8% der Patienten durch Transplantatversagen zu erneuter Instabilität, was wiederum eine operative Revision nötig machen kann.(28)

Eine genaue Einteilung der einzelnen Komplikationen nach VKB-Plastiken ist schwer vorzunehmen, da meist mehrere Faktoren gleichzeitig eine Rolle spielen. Harner et al.

EINLEITUNG

unterscheiden drei große Bereiche, die zu Fehlern bei bzw. nach einer Kreuzband Plastik führen können: Operationstechnik, Transplantat Integration und Traumata. Diese drei Probleme können sowohl kombiniert als auch getrennt voneinander vorkommen, was bei Harner et al. in folgender Abbildung verdeutlicht wird.(28)

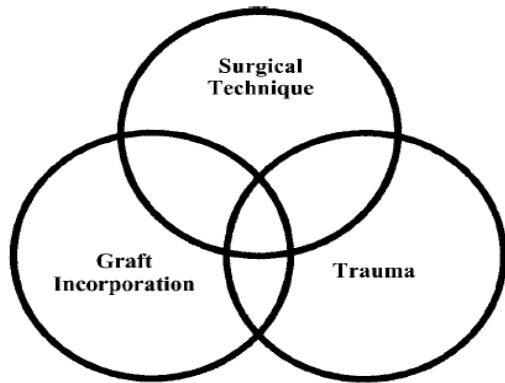


Abbildung 2: mögliche postoperative Problematiken nach Kreuzbandplastik
aus (28)

OP-technische Probleme können entstehen durch eine falsche Platzierung der Sehne im Bohrkanal, Impingement des Transplantat, falsche Spannung des Transplantats und unzureichende Fixation.

Bei den Traumata unterscheidet man wiederum diejenigen vor vollständiger Integration des Transplantats, zum Beispiel durch zu intensive Rehabilitation und diejenigen, nach kompletter Integration des Transplantates, durch erneute Verletzungen. (28) (21)

Auf den Bereich der „Transplantat Integration“ soll hier etwas genauer eingegangen werden, da er für diese Arbeit von besonderem Interesse ist. Nach erfolgreicher Bandrekonstruktion ist das Einwachsen des Transplantats in den Knochen von entscheidender Bedeutung für das Operationsergebnis.(28) Dieser Vorgang ist ein biologischer Prozess, der nur bei optimalen Stoffwechselbedingungen funktionieren kann und über einen Zeitraum von mehreren Wochen andauert.

Im Folgenden werden die biologischen Mechanismen dargestellt, die bei der ossären Integration des Sehnentransplantats ablaufen und mögliche Probleme im Zusammenhang mit diesem Prozess aufgezeigt. (21, 28, 46)

- *Nekrose der Transplantate:* Die Nekrose der transplantierten Sehne findet innerhalb der ersten 3-4 Wochen nach Operation im zentralen Teil der Sehne statt. Sie ist ein physiologischer Vorgang, der vonnöten ist, um eine Integration zu gewährleisten. Als Reaktion auf die Nekrose werden Zytokine ausgeschüttet,

EINLEITUNG

die wiederum Wachstumsfaktoren aktivieren, welche die Integration der Sehne in den Knochen triggern.(46)

- *Revaskularisierung:* Durch frühe Revaskularisierung können Zellen in die Sehne einwandern und Wachstumsfaktoren produzieren, damit eine Integration von Transplantat in den Knochen stattfinden kann. Die Revaskularisierung beginnt in der Regel 3 Wochen postoperativ. Nach 6-8 Wochen sind die Sehnen gut perfundiert. Probleme in der Revaskularisierung kann es durch übermäßige Spannung des Transplantates geben, wodurch eine Veränderung der histologischen Eigenschaften der Sehne entstehen kann. Auch bei Risikopatienten, wie Rauchern und Drogenabhängigen, ist die Revaskularisierung verlangsamt. Ein weiterer Grund für Probleme bei der Blutversorgung ist die falsche Auswahl des Transplantats (Autografts revaskularisieren früher und in tieferen Ebenen als Allografts). (46)
- *Zelluläre Repopulation und Proliferation:* Die zelluläre Repopulation mit mesenchymalen Stammzellen und regenerativen Fibroblasten ist im Normalfall 12 Wochen nach der Operation abgeschlossen. Dieser Vorgang ist allerdings von der Anwesenheit einer ausreichenden Anzahl von Wachstumsfaktoren abhängig.(46)
- *Kollagen Remodeling u. Ligamentisation:* Die Kollagenfibrillen der transplantierten Sehne sind anders angeordnet als im ursprünglichen Kreuzband. Durch Remodeling Prozesse wird das Transplantat jedoch im Laufe der Zeit so umgebaut, dass eine ähnliche Ausrichtung wie im originären VKB erreicht werden kann. Für das Remodeling des Transplantats sind ebenfalls die oben beschriebenen Faktoren notwendig: gute Revaskularisierung, Wachstumsfaktoren und adäquate mechanische Kraftverteilung im Sehnen transplantat.(46)
- *Immunologie:* Erweiterungen des Bohrkanals sind ebenfalls Probleme der fehlenden Knochen-Sehnen-Integration. Diese Komplikation ist bei Allograft Transplantaten häufiger beobachtet worden als bei Autograft Transplantaten, was eventuell an immunologischen Abwehrreaktionen gegen die Allografts liegen kann. (46, 64)

Das Einwachsen des Transplantats ist ein komplexer Prozess, bei dem verschiedene Mechanismen gleichzeitig ablaufen müssen. Hierbei spielen Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Integration von transplantierte Sehne in den

Knochen. Welche genaue Bedeutung den Bone Morphogenetic Proteins hierbei zukommt und ob durch ihre Applikation eine Veränderung der Knochen-Sehnen-Interaktion stattfindet, ist Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

1.2 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

1.2.1 Entdeckung und Struktur

Schon früh lassen sich in der Literatur erste Hinweise auf die Entdeckung der Bone morphogenetic Proteins finden. Senn hat bereits im Jahr 1889 in einer Arbeit versucht osteomyelitische Defekte antiseptisch zu behandeln. Er benutzte entkalkifizierte Knochensubstanz, die in Iododform getränkt war, um einen durch Osteomyelose entstandenen Defekt zu behandeln. Das Ergebnis war zum einen ein Rückgang der Entzündung und zum anderen eine Neubildung von Knochengewebe. (61)

Im Jahr 1965 wurde das Phänomen der Knocheninduktion/Osteoinduktion von Urist beschrieben. Mit Salzsäure dekalzifizierte Knochenzylinder wurden in Muskelgewebe von Ratten injiziert und bewirkten dort eine ektope Knochenneubildung. (69)

Diese Entdeckung wurde auf die Anwesenheit von Proteinen in der entkalkten Knochenmatrix zurückgeführt, die er „bone morphogenetic proteins“ (BMP) nannte. (70)

Allerdings konnte für diese Entdeckung erst Anfang der 80er Jahre ein reproduzierbarer BioAssay von Sampath und Reddi entwickelt werden und somit letztendlich der Beweis erbracht werden, dass wirklich der Proteinanteil der entkalkten Knochenmatrix für die Induktion der Knochenneubildung verantwortlich ist. (58)

Nach dieser Entdeckung begann die Verwendung von BMPs in klinischen Studien.

Der letztendliche Startschuss für zahlreiche Experimente mit den Bone Morphogenetic Proteins wurde allerdings erst im Rahmen der Gensequenzierung verschiedener BMPs Ende der 1980er Jahre gelegt. Durch diese Erfindungen konnten die sonst so schwer zu isolierenden Stoffe nun viel billiger und in größerer Menge hergestellt werden. (54)

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind eine Gruppe von 15-30 kDa schweren Molekülen, die zur TGF β Superfamilie gehören. Die TGF β Familie ist einer Gruppe von multifunktionalen Zytokinen, die eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und bei Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen von Zellen und Geweben spielen. (60)

EINLEITUNG

In der Literatur werden aktuell mehr als 16 verschiedene BMPs beschrieben. Sie lassen sich aufgrund von Ähnlichkeiten in der Molekülstruktur in verschiedene Subgruppen unterteilen (Abb.). Eine Ausnahmestellung nimmt das BMP-1 ein, welches nicht zur Superfamilie des TGF β gezählt wird. BMP-1 ist eine Proteinase, die beim Umwandlungsprozess von Prokollagen zu Kollagen eine Rolle spielt. (12, 14, 67)

TABLE I Classification of BMPs*		
BMP Subfamily	BMP Molecule	Synonym
BMP-2/4	BMP-2	BMP-2A
	BMP-4	BMP-2B
BMP-3	BMP-3	Osteogenin
	BMP-3B	GDF-10
BMP-7	BMP-5	
	BMP-6	Vgr-1
	BMP-7	OP-1
	BMP-8	OP-2
	BMP-8B	OP-3
CDMP/GDF	BMP-12	CDMP-3 or GDF-7
	BMP-13	CDMP-2 or GDF-6
	BMP-14	CDMP-1 or GDF-5
Miscellaneous	BMP-9	GDF-2
	BMP-10	
	BMP-11	GDF-11
	BMP-15	
	BMP-16	

Abbildung 3: Klassifikation der verschiedenen Bone Morphogenetic Proteins

GDF = growth differentiation factor, Vgr = vegetal related, OP = osteogenic protein, and CDMP = cartilage-derived morphogenetic protein, aus: (67)

BMPs bestehen aus Dimeren, deren Ketten über Disulfidbrücken verbunden sind. Sie können sowohl als Homodimere (zwei identische Ketten) als auch als Heterodimere (zwei unterschiedliche Ketten) aktiv sein. (25)

BMP-2 ist einer der Hauptvertreter der Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins. In seiner biologisch aktiven Form ist BMP-2 ein Homodimer. Die einzelnen Monomere sind Proteine mit nur einer Domäne und bestehen aus 114 Aminosäure Resten. Jedes der BMP-2 Monomere enthält einen Cystein Kern, der aus 6 Cystein Resten besteht. Diese Cystein Reste bilden drei intramolekulare Disulfid Brücken aus.

Die eben beschriebene cystein-knot Region gilt als ein Hauptstrukturmerkmal der TGF β Superfamilie und ist vor allem für die Stabilisierung des Moleküls von Bedeutung.

EINLEITUNG

Die Faltstruktur entspricht derjenigen der TGF β Superfamilie. Zwei separate antiparallele β -Faltblätter, von denen die zweite eine gedreht gekreuzte Konformation einnimmt, und eine vierfach gedrehte α -Helix, die ungefähr senkrecht zu den β Strängen verläuft. (10)

Die Faltblattstruktur wurde als eine Hand beschrieben, bei der die Helix das Gelenk, der Zystinkern die Handfläche und die β Faltblätter die Finger beschreiben. (60)

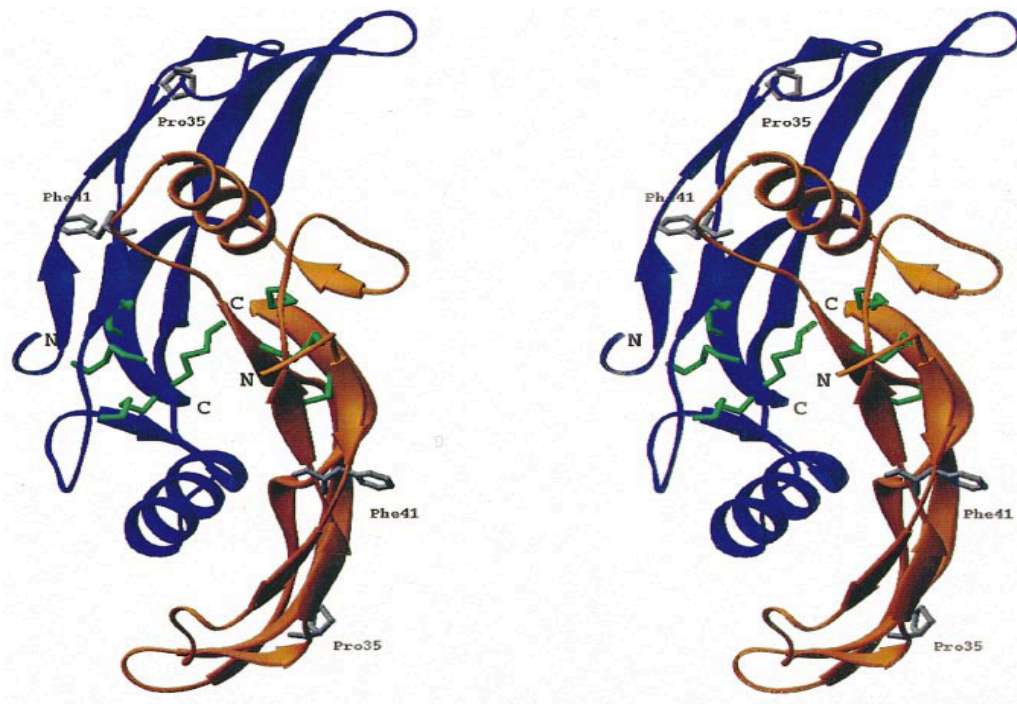


Abbildung 4: BMP2 Struktur

Faltstruktur des nativen BMP-2 Dimers, alpha Helices sind als blaue Spiralen, beta Stränge als Pfeile dargestellt. Die grünen Stäbe sind Disulfidbrücken. Die Untereinheiten sind blau und orange dargestellt, aus: (60)

1.2.2 Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Signaltransduktion der Bone Morphogenetic Proteins läuft, bis auf wenige Modifikationen, ähnlich wie die der restlichen Gruppe der TGF- β Familie ab. Um diesen Mechanismus zu verstehen ist es zunächst wichtig, Aufbau und Funktion der Rezeptoren der BMPs zu kennen.

Die Mitglieder der TGF- β Familie binden an zwei Typen von Serin-Threonin-Kinase Rezeptoren: Typ I und Typ II Rezeptor. Es wurden 6 verschiedene „Untertypen“ dieser Rezeptoren identifiziert, die BMP binden. Zu den Typ I Rezeptoren gehören: Activin

EINLEITUNG

Rezeptor Typ Ia (ActRIa oder Alk2), BMP Rezeptor Typ Ia (BRIa oder Alk3) und BMP Rezeptor Typ Ib (BRIb oder Alk6). Diese bilden Komplexe mit folgenden Typ II Rezeptoren: BMP Rezeptor Typ II (BRII), Aktivin Rezeptor Typ IIA und IIB (ActRIIA und ActRIIB).

Der Typ I Rezeptor besitzt zwei wichtige Merkmale. Eine Glycin/Serin reiche Region (=GS-box), die N terminal seiner Serin/Threonin Kinase Domäne sitzt. Die Typ II Rezeptor Kinase ist im Gegensatz zum Typ I Rezeptor ständig aktiv. (33, 52, 63, 72)

In Abwesenheit vom Typ II Rezeptor binden die BMPs an den Typ I Rezeptor. Sind beide Rezeptortypen anwesend, so steigt die Bindungsaffinität enorm an. Die Typ II Rezeptor Kinase phosphoryliert die GS Domäne des Typ I Rezeptors, welcher dann die intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt. (44, 45)

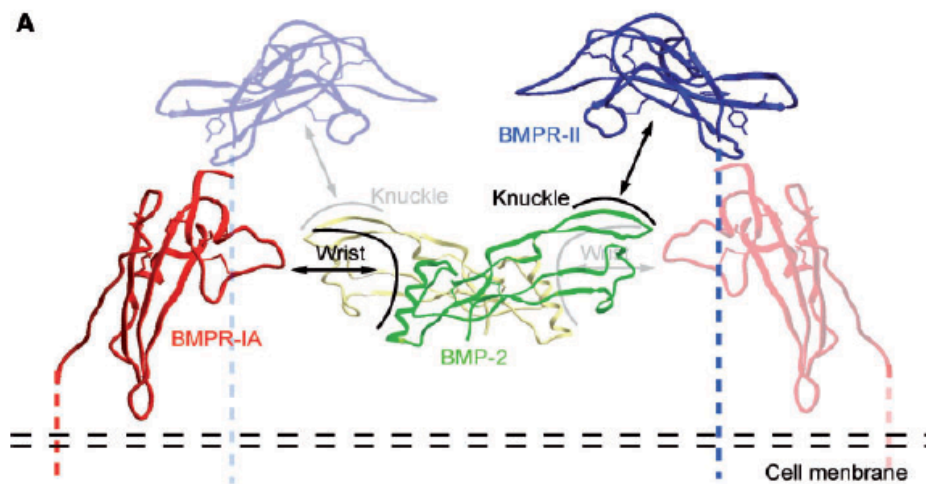


Abbildung 5: Bindung von BMP 2 an Rezeptor

Seitenansicht der Bindung von BMP 2 an Typ I und Typ II Rezeptoren, aus: (44)

Dieser Weg bis zum Zellkern läuft über spezielle Signalmoleküle, sog. Smads.

Smad Proteine sind die Haupt Signalmoleküle für die Rezeptoren der TGF- β Familie. In Säugetieren wurden bislang 8 verschiedenen Smad Moleküle identifiziert. Smad 1, 5 und 8 sind R-Smads (= rezeptor aktivierte Smads), die im BMP Signalweg von Bedeutung sind. Smad 2 und Smad 3 sind für den TGF- β /Aktivin Signalweg zuständig. Die R-Smads haben hohe strukturelle Ähnlichkeit zueinander und alle funktionellen Unterschiede sind bei weitem noch nicht bekannt. Smad 4 ist das einzige co-Smad in Säugetieren, das von beiden Signalwegen verwendet wird. Smad 6 und Smad 7 gehören zu den I-Smads (=inhibitorische Smads).

EINLEITUNG

Die R-Smads werden vom Typ I Rezeptor phosphoryliert und bilden anschließend einen dimeren Komplex mit dem Co-Smad (Smad 4). Dieser Komplex transloziert in den Zellkern und kann auf verschiedene Arten die Transkription von Zielgenen auslösen:

- durch direkte Bindung an die DNA
- durch Interaktion mit anderen DNA bindenden Proteinen
- durch Rekrutierung von Koaktivatoren/Korepressoren der Transkription (42)

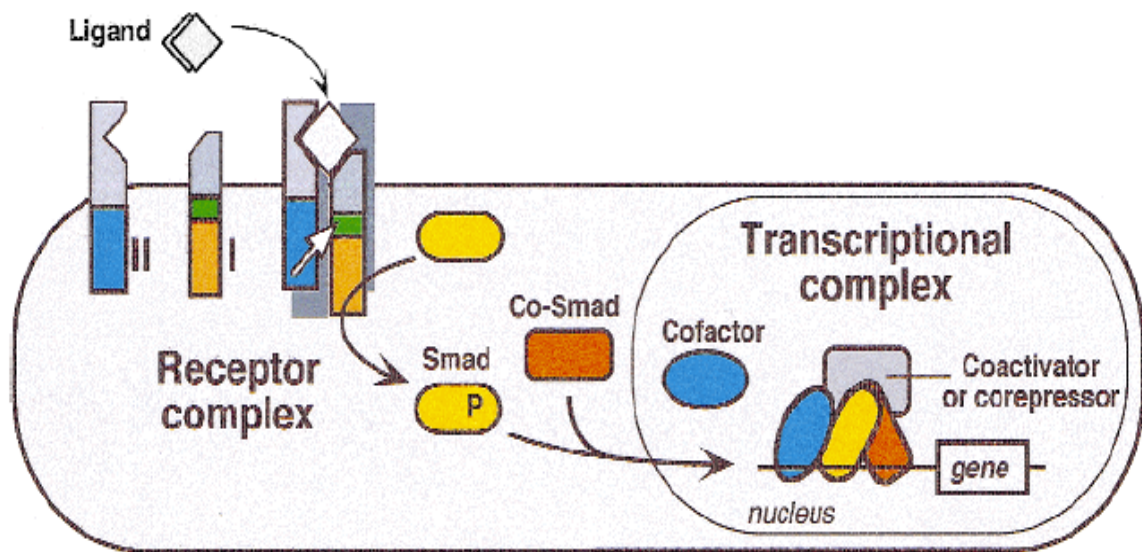


Abbildung 6: TGF- β Signalweg via SMADs

aus: (42)

Ein wichtiger Weg soll hier kurz aufgezeigt werden, da er eine zentrale Rolle in der Induktion der Osteoblasten Differenzierung spielt. Der oben erwähnte Komplex aus R-SMAD und Co-SMAD bindet dabei an den Transkriptionsfaktor Runx2 (=Cbfa1). Runx ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die verschiedene biologische Prozesse, wie die Hämatopoese und die Osteogenese regulieren. Sie besitzen eine Domäne, die als RUNT Domäne bezeichnet wird, mit Hilfe der sie an die DNA binden können. Die Gruppe aus SMAD, Co-SMAD und Runx2 kann dann die Transkription von Zielgenen für die Differenzierung von Osteoblasten induzieren. Im Laufe der Zeit sind zahlreiche BMP Zielgene in verschiedenen Zellen identifiziert worden. Im Rahmen der Osteoblasten Differenzierung aktiviert BMP-2 verschiedene Gene, die in „Früh-

EINLEITUNG

Antwort-Gene“ (2 Stunden nach BMP Stimulation) und „Spät-Antwort-Gene“ (6-24 Stunden nach BMP Stimulation) eingeteilt werden können. Zu den ersteren gehören: OASIS, Prx2, TIEG und Snail; zu den letzteren: Hey1 und Tcf7. (44) (32) (2) (57)

1.2.3 Antagonisten der BMPs

Es sind bereits eine Reihe von Mechanismen beschrieben worden, die auf unterschiedliche Weise in die oben beschriebene Signalkaskade eingreifen und den Weg vom Signal bis hin zur Transkription hemmen können.

Eine Einteilung in verschiedene Gruppen kann wie folgt vorgenommen werden (7):

- BMP Pseudorezeptoren, die kein Signal weiterleiten
- inhibitorische SMADS
- intrazelluläre SMAD bindende Proteine
- Ubiquitinisierung und Degradierung von SMADS
- extrazellulär bindende BMP Antagonisten

Im Folgenden wird aufgrund der Relevanz für diese Arbeit nur auf die letzte Gruppe genauer eingegangen.

Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die extrazellulären BMP Antagonisten, die von Osteoblasten exprimiert werden.

	Expressed	BMP induced
Noggin	+	+
Chordin	+	–
Ventropin	Not tested	
Follistatin	+	–
FLRG	Not tested	
Tsg	+	–
Dan	+	–
Cerberus	–	–
PRDC	+	+
Dante and Caronte	Not tested	
Gremlin/drm	+	+
Sclerostin/SOST	+	+

Abbildung 7: BMP Antagonisten

Expression von extrazellulären BMP Antagonisten in Osteoblasten, aus: (7)

EINLEITUNG

Zu den bekanntesten Antagonisten der BMPs gehören die beiden Proteine Noggin und Chordin. Noggin ist ein kleines Glykoprotein (32 kD), Chordin ein großes Protein (120 kD). Beide binden spezifisch, jedoch mit unterschiedlicher Affinität an BMPs und antagonisieren den BMP Signalweg, indem sie die Bindung von BMP an seinen Rezeptor verhindern. Im Gegensatz zu Chordin wird die Expression von Noggin auch durch BMP Anwesenheit induziert, was als ein Schutzmechanismus für eine zu starke Aktivierung des Signalwegs interpretiert werden kann. (7)

1.2.4 Funktion der BMPs

Wie bereits erwähnt, gibt es verschiedene BMPs, denen natürlich auch unterschiedliche Funktionen zugewiesen werden. Neben ihrer Rolle in Chondrogenese und Osteogenese wurden unter anderem Wirkungen auf Herz-, Nieren und Augenentwicklung beschrieben. (26) Thawani et al. geben in der folgenden Tabelle einen Überblick über die verschiedenen Wirkfelder der Bone Morphogenetic Proteins. (9, 68)

TABLE 1. Functions of bone morphogenetic proteins^a	
BMP	Functions
BMP1	Chondrogenesis, extracellular matrix maintenance, dorsoventral patterning.
BMP2	Osteoblast differentiation, osteogenesis, and chondrogenesis. Potential roles in apoptosis and as a retinoid mediator. Involved in dorsoventral patterning and craniofacial development. Heart development.
BMP3a/b (osteo-genin/GDF-10)	Osteogenesis inhibitor, dorsoventral patterning.
BMP4	Fracture repair. Formation of teeth, limbs, lung, eye, and bone from mesoderm. Involved in dorsoventral patterning and craniofacial development.
BMP5	Chondrogenesis.
BMP6 (Vgr-1)	Osteogenesis and chondrogenesis. Involved in joint integrity.
BMP7 (OP-1)	Osteoblast differentiation, eye development, renal development/repair, and craniofacial development. Possible cerebral protection from ischemic stroke.
BMP8a/b (OP-2/3)	Osteogenesis, chondrogenesis, craniofacial development.
BMP9	Chondrogenesis, nervous system development, hepatogenesis, hepatic reticuloendothelial system development.
BMP10	Trabeculation of embryonic heart.
BMP11 (GDF-8)	Mesodermal patterning and nervous system development.
BMP12 (GDF-7/CDMP-3)	Joint morphogenesis. Facilitates growth of ligament, tendon.
BMP13 (GDF-6/CDMP-2)	Joint morphogenesis. Facilitates growth of ligament, tendon.
BMP14	Chondrogenesis, limb development, fracture healing, facilitates growth of tendon.
BMP15	Oocyte and follicular development.

^a BMP, bone morphogenetic protein; GDF, growth differentiation factor; OP, osteogenic protein; CDMP, cartilage-derived morphogenetic protein. References 22, 25, 34, 52-54, 91, 94, 98, 99, and 106.

Abbildung 8: Funktionen der Bone Morphogenetic Proteins

aus: (68)

1.2.5 Einsatzgebiete der BMPs in der Medizin

BMPs finden heutzutage in vielen Bereichen der Medizin eine breite Anwendung. Nicht nur in Onkologie, Gastroenterologie und Kardiologie, sondern auch in Gebieten wie der Neurologie und der Reproduktionsmedizin findet Forschung und klinische Erprobung dieser Proteinklasse statt.

Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Interesse in der Untersuchung der BMP Verwendung im unfallchirurgischen/orthopädischen Bereich. Der klinische Einsatz erfolgt hier bereits in verschiedenen Teilfeldern:

- Einsatz zur Verbesserung der Frakturheilung
- Einsatz zur Induktion der Ossifikation (z.B.: bei Heilung von Defekten kritischer Größe, Pseudarthrosen)
- Einsatz in der Endoprothetik (zur Verbesserung der Implantat Integration)
- Einsatz in der Wirbelsäulen Chirurgie (bei Spondylodesen)
- Einsatz bei Patienten mit Risikoerkrankungen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen (z.B.: Raucher etc.) (22)

Eines der größten Einsatzgebiete der BMPs ist wohl der Bereich der Frakturheilung. Nachweisbar wird die Frakturheilung durch BMPs verbessert bzw. verstärkt. In neueren Studien wurde von Ristiniemi et al. der Einsatz von BMP bei der Versorgung von distalen Tibiafrakturen mit externen Fixateuren in einer Fall-Kontroll-Studie untersucht. Die durchschnittliche Heilungszeit bei der Gruppe, die BMP erhielt, war signifikant kürzer als bei der Kontrollgruppe.(53) Giannoudis et al. konnten ein positives Outcome für den Einsatz von BMP bei der Versorgung von Beckenringfrakturen aufzeigen. (23)

Die Induktion der Knochenneubildung wird durch BMP nachweislich gefördert. Es gibt mehrere klinische Studien in denen die Art und Weise, wie BMP die Heilung von Knochendefekten kritischer Größe und Pseudarthrosen fördert, beschrieben wird.(22)

Ein positiver Einfluss von BMP in der Integration von Implantaten wird vermutet und wurde von Zhang et al. im Hasenmodell beschrieben. Jedoch fehlen randomisierte kontrollierte Studien um diese Thesen zu stützen. (86)

Der Einsatz von Bone Morphogenetic Proteins in der Wirbelsäulen Chirurgie findet sich vor allem im Bereich der Spondylodesen. Mehrere Studien über die Applikation von BMPs bei operativer Versorgung von Instabilitäten der Wirbelsäule durch Versteifung von Wirbelkörpersegmenten haben einen positiven Effekt dieser Proteine auf die

Durchbauung der Spondylodese gezeigt. Der klinische routinemäßige Einsatz ist allerdings noch beschränkt. (11, 22, 77)

1.3 Beteiligte Zelllinien und Gewebe in Zellkultur und Kreuzbandchirurgie

1.3.1 Histologischer Aufbau von Sehnen

Sehnen und Bänder bestehen aus straffem kollagenfaserigen Bindegewebe. Die besonderen Eigenschaften dieser Gewebeart werden vor allem durch ihre extrazelluläre Matrix bestimmt, in der Kollagen die vorherrschende Faserart ist.

Der zelluläre Anteil wird zu 95% von Tendinozyten/Tendinoblasten gebildet. Es sind noch zahlreiche andere Zelltypen, wie Chondrozyten, Synovialzellen und Endothelzellen in diesem Gewebe zu finden, die für die Funktion der Sehne aber eine eher untergeordnete Rolle spielen.(31, 55)

Die Sehnenzellen gehören zu den Fibroblasten. Man unterscheidet Tendinoblasten (juvenile Zellen) und Tendinozyten (adulte Zellen).

Die Tendinoblasten sind sehr stoffwechselaktive Zellen. Sie besitzen ein gut ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum (rER), zahlreiche Mitochondrien und einen ebenfalls gut entwickelten Golgi-Apparat. Ihre Hauptaufgabe ist die Produktion von Bestandteilen der extrazelluläre Matrix, wie Kollagen, Elastin, Proteoglykanen und Glykoproteinen.(30, 31, 55)

Die Tendinozyten (Tenozyten) werden in der Fachliteratur auch als „Flügelzellen“ bezeichnet. Der Begriff „Flügelzelle“ kommt von den flügelartigen langen dünnen Fortsätzen, die im histologischen Querschnitt gut zu erkennen sind. Mit diesen Fortsätzen umfassen sie Kollagenfaserbündel in der Nachbarschaft. Tendinozyten sind Zellen verschiedener Form (spindelförmig, länglich) und Größe. Ihre Kerne sind meist dünn und flach, können jedoch in ihrer Form variieren. Im Vergleich zu den Tendinoblasten besitzen sie eine geringere Anzahl von Mitochondrien, ein schlechter ausgebildetes rER, sowie einen nicht so hoch entwickelten Golgi Apparat. Aufgrund dieser Organellenstruktur ist die Produktionsleistung der Tendinozyten eher gering. Sie können sich allerdings wieder in Tendinoblasten zurückentwickeln und damit erneut eine höhere Stoffwechselsarbeit leisten.(30, 31, 55)

Wie zuvor bereits erwähnt, werden die Eigenschaften des straffen Bindegewebes vor allem durch die extrazelluläre Matrix bestimmt. Der vorherrschende Fasertyp sind

EINLEITUNG

Kollagenfasern. In geringerem Anteil finden sich Elastine, Glykoproteine und Proteoglykane.

Die Kollagenfasern entstehen aus kleinen Mikrofibrillen, die vor allem Kollagen Typ-I enthalten. Mehrere parallel angeordnete Mikrofibrillen, eingebettet in EZM, bilden eine Kollagenfaser. Einige dieser Kollagenfasern schließen sich zusammen und bilden ein Primärbündel (Subfaskikel). Diese Subfaskikel werden von Endotendineum umgeben. Viele Primärbündel schließen sich zu einem Sekundärbündel (Faskikel) zusammen. Viele Sekundärbündel wiederum zu einem Tertiärbündel. Die endgültige Sehne wird von mehreren Tertiärbündeln gebildet, die von Epitendineum umgeben sind. Als äußerste Schicht gilt das Peritendineum, welches häufig vom Epitendineum durch einen Flüssigkeitsfilm, zur Verminderung von Reibung, getrennt ist. (30, 31, 47, 55, 76)

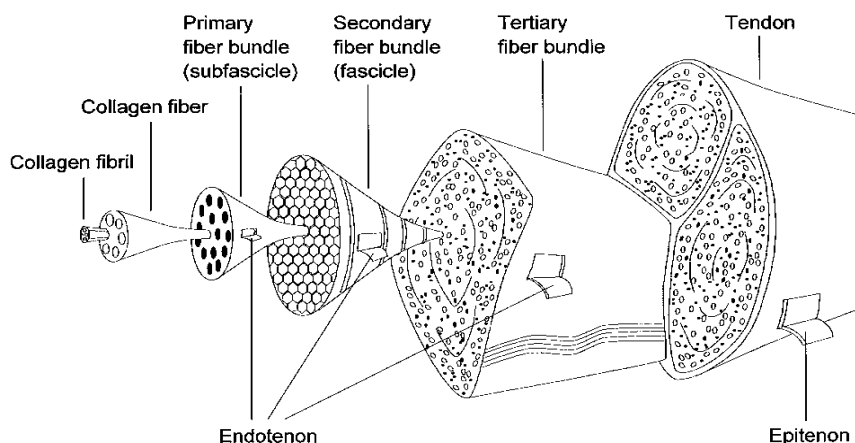


Abbildung 9: Darstellung des Sehnenaufbaus

Organisation der Sehnenstruktur von den Kollagenfibrillen bis hin zur kompletten Sehne, aus: (31)

1.3.2 Ultrastruktur des Knochens

Knochen ist eine besondere Form des Bindegewebes. Er besteht, wie andere Bindegewebsarten auch, aus Zellen und extrazellulärer Matrix. Der entscheidende Faktor, der Knochen von anderen Bindegewebsarten unterscheidet, ist die Mineralisation seiner Matrix, die aus ihm ein extrem hartes und einzigartiges Gewebe macht. (55)

1.3.2.1 Zelluläres Kompartiment

Zu den zellulären Bestandteilen des Knochens gehören fünf verschiedene Arten von Zellen: Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten, Bone-lining Zellen und die Osteoclasten. (27)

Osteoprogenitorzellen stammen von mesenchymalen Stammzellen ab. Sie sind sog. „ruhende“ Zellen und können sich nach Stimulation in Osteoblasten umwandeln, um Knochen-Matrix zu bilden. (55)

Die Osteoblasten sind sekretorisch aktive Zellen, die von den oben genannten Osteoprogenitor Zellen abstammen. Sie können zum einen Typ I Kollagen und zum anderen Knochenmatrix Proteine produzieren. Zu den von Osteoblasten gebildeten Proteinen gehören Calcium bindende Proteine, wie Osteocalcin und Osteonectin; multiadhäsive Glykoproteine, wie Knochensialoproteine I und II, Osteopontin, Thrombospondin; verschiedene Proteoglykane und die membranassoziierte alkalische Phosphatase (ALP). In der laborexperimentellen Routine werden zum einen die ALP und zum anderen das Osteocalcin häufig als Marker für die Osteoblastenaktivität genutzt. Auch in unseren Experimenten greifen wir auf die Bestimmung dieser beiden Proteine zurück, um Rückschlüsse auf die Osteoblastenaktivität zu ziehen. (15, 27, 55)

Osteoblasten haben eine kubische oder polygonale Form. Sie besitzen einen hellen Zellkern, haben ein gut ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum und einen großen Golgi-Apparat. Über gap junctions können sie mit anderen Osteoblasten oder Osteocyten kommunizieren.(13) In Zellkultur sind Osteoblasten nur schwer von Fibroblasten zu unterscheiden. In unserem Zellkulturexperiment werden primäre bovine Osteoblasten verwendet, die zuvor eigens aus bovinem Periost in Zellkulturmedium herangezüchtet wurden (die genaue Methodik wird im Methodenteil erläutert).

Wenn Osteoblasten komplett von Osteoid oder Knochenmatrix umschlossen sind, werden sie als Osteozyten bezeichnet. Eine wichtige Aufgabe der Osteozyten ist es, die Knochen Matrix aufrecht zu erhalten. Osteozyten besitzen zahlreiche Fortsätze, mit denen sie Verbindungen (Nexus) zu benachbarten Osteozyten herstellen können. Hierdurch wird ein Stofftransport von Osteoblasten, die an der Knochenoberfläche sitzen, bis in die Tiefe der Knochensubstanz möglich. Die Syntheseleistung der Osteozyten ist geringer als die der Osteoblasten. Daher ist es verständlich, dass die Zellorganelle (rER, Golgi Apparat, Mitochondrien) nicht so stark ausgeprägt sind. (15, 27, 55)

EINLEITUNG

Bone-lining Zellen stammen ebenfalls von Osteoblasten ab. Sie werden auch als inaktive Osteoblasten bezeichnet und befinden sich vor allem im ruhenden Knochen. Auch diese Zellart bildet gap junctions, über die Informationen mit anderen Zellen ausgetauscht werden können. (27, 55)

Osteoclasten sind vielkernige Riesenzellen (z.T. über 100 Kerne), die für die Resorption mineralisierter Matrix zuständig sind. Sie sind hämatopoetischen Ursprungs und werden bei der Fusion von mononukleären Progenitorzellen gebildet. Die Osteoklasten liegen in sog. Howship-Lakunen (flache Aushöhlungen der Knochenoberfläche). Sie besitzen viele Mitochondrien und Lysosomen um ihrer Hauptaufgabe, der Resorption, nachzukommen. (15, 27, 55, 76)

1.3.2.2 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix besteht vor allem aus Wasser, anorganischen Mineralsalzen (v.a. Hydroxyapatit), Kollagen (30-40%) und NCP (=non-collagenous protein) (5%).

Hauptkollagen ist Kollagen Typ I (wie in Haut und Sehnen), nur geringe Mengen von Kollagen Typ III, IV, IX sind vorhanden. (85)

NCP sind komplexe Moleküle, die sowohl exogener (v.a. serum-derived proteins) als auch endogener (von Osteoblasten produziert) Herkunft sind. Von Osteoblasten werden hierbei vor allem die alkalische Phosphatase (ALP), das Osteocalcin, und das Osteonectin produziert. (85)

1.3.2.3 Mineralisationsprozess

Damit extrazelluläre Matrix mineralisieren kann, muss die lokale Konzentration von Ca^{2+} und PO_4^{3-} Ionen stark ansteigen. Es gibt verschiedene Mechanismen, die dafür verantwortlich sind (49, 55, 76, 85):

- Grundvoraussetzung für den Mineralisationsprozess ist eine bestimmte Konzentration von Ca^{2+} und anorganischem Phosphat in der extrazellulären Matrix
 - Das extrazelluläre Ca^{2+} wird von Osteocalcin und anderen Sialoproteinen gebunden. Hierdurch wird eine hohe lokale Konzentration von Kalzium Ionen erreicht.

EINLEITUNG

- Durch die hohe Ca^{2+} Konzentration werden die Osteoblasten stimuliert alkalische Phosphatase zu sezernieren. ALP ist in der Lage anorganisches Pyrophosphat (hemmt Mineralisationsprozess) zu anorganischem Phosphat zu hydrolysieren und somit die idealen Bedingungen für die Mineralisation zu schaffen.
- Wenn diese hohen Konzentrationen von extrazellulärem Ca^{2+} und PO_4^{3-} erreicht sind, setzen die Osteoblasten durch Exozytose kleine Vesikel in die Knochenmatrix frei. Diese Vesikel sind reich an verschiedenen Phospholipiden, v.a. von Phosphatidylserin, ein Lipid mit hoher Affinität für Ca^{2+} Ionen. Außerdem enthalten sie ALP und Pyrophosphatasen.
- Der Mineralisationsprozess findet anschließend in 2 Schritten statt:
 - Hydroxylapatitkristalle werden zunächst innerhalb der Matrixvesikel gebildet
 - Anschließend erfolgt der Transport dieser Kristalle in die extrazelluläre Matrix
- Der Prozess der Bildung von Hydroxylapatit in den Matrix Vesikeln ist noch nicht komplett verstanden. Durch verschiedene Mechanismen (aktive/passive Transporte, Hydrolysen etc.) werden zum einen Ca^{2+} Ionen und zum anderen PO_4^{3-} Ionen in die Vesikel befördert und akkumulieren dort.
- Wird durch diesen Vorgang der lokale isoelektrische Punkt für CaPO_4 erreicht, lagern sich die Kristalle in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) zusammen. Anschließend penetrieren diese Hydroxylapatit Kristalle die Vesikelmembran und gelangen so in die extrazelluläre Matrix, wo sie sich unter den oben beschriebenen Bedingungen miteinander verbinden und große Komplexe bilden. (49, 55, 76, 85)

1.4 Fragestellung und Grundüberlegung:

Die Kreuzbandchirurgie ist immer wieder Gegenstand der aktuellen Wissenschaft. Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik im Rahmen der Operation und der langwierigen Rehabilitation sind Verbesserungen in diesem Bereich von großem medizinischen Interesse.

EINLEITUNG

Bone Morphogenetic Proteins sind bekannte Wachstumsfaktoren in der operativen Medizin mit vielen verschiedenen Einsatzmöglichkeiten. Groß angelegte Untersuchungen für eine Verwendung im Bereich der Kreuzbandchirurgie bestehen allerdings zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht.

Um zunächst die ablaufenden Prozesse während der ossären Integration von Sehnen zu verstehen, soll ein in vitro Zellkulturmodell auf Basis einer Knochen Stammzellkultur entwickelt werden, auf dessen Grundlage künftig Untersuchungen im Bereich der Knochen-Sehnen-Interaktionszone durchgeführt werden können.

In einem zweiten Schritt möchten wir den Prozess der Knochen-Sehnen-Interaktion unter Zugabe des Wachstumsfaktors BMP-2 genauer untersuchen. Die Ergebnisse werden zum einen biochemisch, zum anderen histologisch und elektronenmikroskopisch ausgewertet und sollen als Basisuntersuchungen für Folgestudien dienen.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Instrumente

Name	Herstellername	Hersteller
Autoklav	Biomedis	Tuttnauer 3850 EL
Brutschrank	Heracell 150	Thermo scientific
Critical point Kammer	Critical Point	Balzers Union
Hubpipette	Multipette plus	Eppendorf
Kühlschrank	Liebherr profi Line	Liebherr
Magnetrührer	Schott	Schott – Instruments
Mikroskop	Leica DMIL	Leica
Mikrotom	PolycutE	Reichert - Jung
Pipette	Gilson pipetman	Gilson
Präzisionswaagen	SBC 32	Scaltec
	MR 2002	Heidolph
REM	ISI-SS40 Scanning E.M.	ISI
Sputter Coater	S 150 Sputter Coater	Edwards
Vakuumpumpe	Vakuumpumpe	Heraeus
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Exatherm P5 electronic	Julabo/scientific Industries
Zellzähler	Casy1	Schärfe System
Zentrifugen	Labofuge 400R	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Centrifuge 5402	Eppendorf

Tabelle 1: Laborgeräte und Instrumente

MATERIAL

2.2 Chemikalien

fertige Chemikalien:

Name	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Cat. Nummer
Accutase	Accutase 100 ml	PAA	L11-007
Aceton	Aceton 2,5 l	Honeywell	10303370
Aluminiumkaliumsulfat	Aluminiumkaliumsulfat		
AmphotericinB	AmphotericinB 100 ml	PAA	P11-001
Aqua dest			
Cacodylic acid	Cacodylic acid 100g	SERVA	15540
Casyton	CASYton	Schärfe System	043-900 37
Chloralhydrat	Chloralhydrat 100g	SIGMA	C-8383
DTT	DTT		
Earl's solution	Earl's solution 500ml	Biochrom Ag	L1915
Essigsäure	Essigsäure 3%		
Ethanol	Ethanol absolut 5l	Fischer GmbH	451-1
Ethanol 70%			
Ethanol 80%			
Ethanol 90%			
Ethanol 100%			
FCS	FCS 500 ml	PAA	A15-101
Fibrinkleber	TISSUCOL Duo S 1ml	Baxter	
Formaldehyd – Lsg.	Formaldehyd – Lsg. 2,5l	Merck	1.04002
Gentamycin	Gentamycin 10 ml	SIGMA	0809M00724
Glutardialdehyd-Lsg.	Glutardialdehyd-Lsg 250 ml	Merck	104.239
Hämatoxylin	Hämatoxylin		
Harnstoff	Urea enzyme grade		
Magnesiumchlorid	Magnesiumchlorid 250g	Merck	5833
MEA	2-Methoxyethylacetat 2,5l	Merck	806.061
Natriumazetat	Natriumazetat		
Natriumchlorid Lösung	NaCl Lsg. 0,9%		
Natriumdisulfit	Natriumdisulfit		
Natriumhydrogencarbonat	Natriumhydrogencarbonat 1kg	Merck	106.329
Natriumjodat	Natriumjodat		
Natriumkarbonat	Natriumkarbonat 1kg	Merck	902
Natriumthiosulfat	Natriumthiosulfat 500g	Merck	6516
Osmiumtetroxid	Osmiumtetroxid		
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd 1kg	Merck	104.005
Pararosanillin	Pararosanillin		
Penicillin	Penicillin		

MATERIAL

Silbernitrat	Silbernitrat	Merck	1512
Streptomycin	Streptomycin		
Sucrose	Sucrose 500g	SIGMA	S-9378
Technovit	Technovit 9100 Neu	Heraeus Kulzer	
TRIS	TRIS 1 kg	USB	22643
TritonX	TritonX 100 ml	SIGMA	T8787
Vit D3	Cholecalciferol 1g	SIGMA	
Xylol	Xylol 2,5 l	J.T.Baker	8118
Zinkchlorid	Zinkchlorid 100g	SIGMA	Z4875
Zitronensäure	Zitronensäure		

Tabelle 2: fertige Chemikalien

angemischte Chemikalien:

- Alcianblaulösung
 - Alcianblau: 1 g
 - Essigsäure 3%ig: 100 ml

- Earle's Solution mit Antibiotikum
 - 500 ml Earle's
 - 250.000 IU Penicillin/Streptomycin (PAA P11-010-10 000 U/ml = 25 ml für 500 ml Earle's)
 - 2 mg Amphothericin B (PAA: P11-001-250µg/ml) 8ml für 500 ml Earle's
 - Genatmicin

- Hämalaun
 - Hämatoxylin: 2,5g
 - Natriumjodat: 0,5g
 - Aluminiumkaliumsulfat: 125 ml
 - Aqua dest.: 2,5 l
 - Chloralhydrat: 125g
 - Zitronensäure: 2,5 g

- Infiltrations – Lsg.

MATERIAL

- Technovit: 250 ml
 - Härter 1: 1g
 - PMMA Puder: 20g
- Natriumkarbonat – Formaldehyd –Lsg.
 - Natriumkarbonat: 10 g
 - Formaldehyd Lsg (wasserfrei): 50 ml
 - Aqua dest.: 150 ml
- Natriumthiosulfat – Lsg.
 - Natriumthiosulfat: 7 g
 - Aqua dest.: 133 ml
- Paraformaldehydlösung 4%ig, pH 7,4
 - 20 g Paraformaldehyd (MERCK) in 500 ml PBS geben
 - ca. 3 Stunden bei 100°C auf Magnetrührer in Lösung gehen lassen
- Perjodsäure 0,5%ig
 - 0,2 M Natriumazetat Lsg.: 10 ml
 - Natriumazetat: 0,272g in 10 ml Aqua dest.
 - Perjodsäure: 0,8g
 - Aqua dest.: 20 ml
 - Ethanol abs.: 70 ml
- Präinfiltrations – Lsg.
 - Technovit: 200 ml
 - Härter 1: 1g
- Primärfixations Lsg. für Elektronenmikroskopie
 - Cacodylic acid : 5,35g
 - Sucrose : 8,56g
 - Glutardialdehyd Lsg. 25 %ig: 30ml
- Schiff'sches Reagenz

MATERIAL

- Pararosanillin: 5 g
 - Salzsäure 1N: 150 ml
- Schneideflüssigkeit
 - Ethanol 60%
- Silbernitratlösung 5 %ig
 - Silbernitrat: 5g
 - Aqua dest.: 100 ml
- Stammlösung II
 - Natriumdisulfit: 5g
 - Aqua dest .: 850 ml
- Stocksolution A
 - Technovit: 500 ml
 - Härter 1: 3g
 - PMMA Puder: 80g
- Stocksolution B
 - Technovit : 50 ml
 - Härter 2 : 4 ml
 - Regulator : 2 ml
- Streckflüssigkeit
 - Ethanol 90%ig
 - Spülmittel: 5ml

MATERIAL

2.3 Puffer

Harnstoffpuffer	Urea enzyme grade	8M	48,48 g/100ml
	DTT	20mM	0,3084g/100ml
Lyse Puffer	MgCl ₂	1mM	203,3 mg/l
	TRIS	20mM	2422,8 mg/l
	ZnCl ₂	0,1mM	13,63 mg/l
	TritonX		250µl/250ml
PBS Dulbeco (500ml)	Biochrom Ag	Cat.Nr.: L 1825	
REM Puffer	Cacodylat	0,1M	21,4 g/l
	Sucrose	0,1M	34,2 g/l

Tabelle 3: Puffer

2.4 Kulturmedium

BGJ Medium Fitton Jackson Modification w/L-Glutamin

- NaHCO₃ 1,2 g/l
- Penicillin/Streptomycin 5ml/l (50.000 U/l)
- Gentamycin 5ml/l (50µg/ml)
- FCS 50 ml/l (10%)
- Vit D3 400 ng/ml
- BMP2 400 ng/ml

2.5 Test-Kits

- Laktat Dehydrogenase (Warburg-reaction)
 - Hersteller: Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
 - Cat. Nr.: 03002098 122
- Laktat (Trinder reaction)

MATERIAL

- Hersteller: Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
 - Cat. Nr.: 11822837 190
- Alkalische Phosphatase (pNA-reaction)
 - Hersteller: Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
 - Cat. Nr.: 12172933 122
- Osteocalcin ELISA 96 Well Plate
 - Hersteller: Micro Vue Bone Health Quidel Corporation
 - Cat.Nr.: 8002

MATERIAL

2.6 Verbrauchsmaterialien

Name	Produktbezeichnung	Firma	Menge	Cat.
Einbettkästen	Einbettkästen	medite medizintechnik		47-1100-00
Einmalhandschuhe	Nobaglove Latex	NOBA Danz	Gr. L	905453
Einmalhandschuhe	Peha Profile Plus	Hartmann	Gr. 8	9426951
Einmalpinzetten	Peha Einmalpinzetten	Hartmann		9995650
Einmalskalpell	Surgical Disposable Scalpel	B/Braun	Gr. 20	5518067
Falcon Tubes	Falcon Tubes	greiner bio-one	15ml	4-2095-6
			50ml	227261
Glaspipetten	Glaspipetten 10ml	greiner bio-one		607180
Kulturgefäße	Cellstar Tissue culture dishes 05	greiner bio-one		639160
	Cellstar Tissue Culture dishes 15	greiner bio-one		664160
	Lumox DISH 35 TC-Qualität	greiner bio-one		9607331
Objektträger	Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific		J1800 AMNZ
Parafilm	Laboratory Film	American National Can TM		
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten Natron-Kalk-Glas	BRAND		747720
Pipettenspitzen	Tip One Bevelled Filter Tips	Tip One	0,1-	S1120-3810
			1-20µl	S1120-1810
			1-50µl	S1120-2810
			1-	S1111-1810
			1-	S1126-7810
Probenbehälter	Probenbehälter	Kobe	Gr. 2,5	0807-31
Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe Lock Tubes	Eppendorf	1,5ml	0030 120.086
			2ml	0030 120.086
Spritzenvorsatzfilter	Spritzenvorsatzfilter	Fisherbrand	Poren	3700699
sterile Abdecktücher	Foliodrape Abdecktücher	Hartmann		2513026
Sterilfilter	Bottle Top Filter	Nalgene	250 ml	291-4520
Zellkulturgefäße	Tissue Culture Flasks 5	greiner bio-one		658170
Zellkulturgefäße	Tissue Culture Plates	greiner bio-one	6 Well	657160
			96	655180

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

3 Methodik

3.1 Grundüberlegungen zum Versuchsaufbau

Um die mögliche Wirkung des Bone Morphogenetic Proteins auf die Knochen-Sehnen-Interaktionen *in vitro* zu untersuchen, werden über einen Zeitraum von 3 Monaten Sehnen in einem Kulturmedium kultiviert. Es werden 4 verschiedenen Gruppen gebildet, die sich in 2 Parametern unterscheiden. Zum einen in der Applikation von BMP 2 und zum anderen in der Applikation von primären bovinen Osteoblasten (POBs), die vorher eigens angezüchtet wurden.

- Gruppe 1: Sehnen mit POB Aussaat mit BMP-2 Applikation (9 Stück)
- Gruppe 2: Sehnen mit POB Aussaat ohne BMP-2 Applikation (9 Stück)
- Gruppe 3: Sehnen ohne POB Aussaat mit BMP-2 Applikation (9 Stück)
- Gruppe 4: Sehnen ohne POB Aussaat ohne BMP-2 Applikation (9 Stück)

Nach vier Wochen werden jeweils 3 Sehnen pro Gruppe entnommen. Zwei davon durchlaufen eine Lyse, damit später aus den Lyseüberständen eine Bestimmung der alkalischen Phosphatase (ALP) durchgeführt werden kann. Die ALP ist membrangebunden und dient als Marker für die Osteoblastenaktivität. Eine Sehne wird für histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen aufbereitet. Zusätzlich erfolgt wöchentlich eine Medienentnahme zur Bestimmung von Analyten, die sowohl Hinweise auf die Mediensituation, als auch auf mögliche Ossifikationsprozesse geben sollen.

Es folgt eine schematische Übersicht zum Verständnis des Versuchsaufbaus:

METHODEN



Abbildung 10: Übersicht des Versuchsaufbaus

3.2 Präparation und Aufbereitung von bovinem Periost und von bovinen Sehnen

Um primäre Osteoblasten (POB) und bovine Sehnen für den Versuch in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurden Rinderunterschenkel präpariert. Die Unterschenkel stammten von ca. 1,5 Jahre alten Rindern und wurden vom Schlachter zur Verfügung gestellt.

Die Rinderbeine wurden vor der eigentlichen Präparation gründlich gereinigt um die Kontamination möglichst gering zu halten. Zunächst erfolgte eine Säuberung der bovinen Unterschenkel mit Seife. Anschließend wurden sie für 30 Minuten in Tücher gewickelt, die in Sterilium getränkt waren. Vor der Präparation wurden die Beine noch einmal mit 70%igem Ethanol abgesprüht.

Die definitive Präparation erfolgte unter dem Abzug auf einer sterilen OP Unterlage.

Für die spätere Anzucht von POBs musste Periost gewonnen werden. Um dieses zu erhalten, wurde das Periost von der Tibia großzügig abpräpariert.

Zur Sehnenpräparation genügte es, sich bis auf die Muskulatur vorzuarbeiten. Die Faszien wurden zur Freilegung vorsichtig eröffnet, damit die Sehnen anschließend aus den Sehnenfächern gelöst werden konnten.

Das Periost wurde in möglichst viele kleine Stücke mit einem Durchmesser von 0,5 cm geschnitten. Die Sehnen mussten vorerst mittels Pinzette und Skalpell von ihrem Peritendineum befreit werden, um anschließend in Stücke mit einer Länge von 2,5 cm geschnitten werden zu können. Es wurde darauf geachtet, dass die Sehnen nicht zu dick und alle möglichst identisch groß waren.

Getrennt voneinander wurden Sehnen und Periost nun für 3x 10 Minuten auf einem Schüttler im Wärmeraum (40 Grad Celsius) in Earl's Solution gewaschen. Als Reaktionsgefäße dienten hierbei Falcon Tubes (50ml). Danach folgten weitere Waschvorgänge für 3 mal 20 Minuten in Earl's Solution mit Antibiotikum (siehe Chemikalien).

3.2.1 Kultivierung von POBs

Zum Anzüchten der POBs wurden ca. 20 Stücke des Periosts in regelmäßigem Abstand voneinander in eine Zellkulturschale (Cellstar Tissue Culture Dish 05) gelegt und mit 15 ml BGJ Medium versorgt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und

5% CO₂ . Es erfolgten regelmäßige mikroskopische Kontrollen, um den Reifegrad der Zellen abzuschätzen. Ein Medienwechsel wurde alle 4 Tage durchgeführt. Nach etwa einer Woche waren die Zellen konfluent gewachsen und konnten abgeerntet werden.

3.3 Aussaat von POB und Fixierung von bovinen Sehnen

3.3.1 Zellzählung von POB und Aussaat

Als die POBs einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, konnten sie abgeerntet werden. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend die Zellkulturschalen 3mal mit 12 ml PBS gewaschen, um den Zellschrott und die toten Zellen zu entfernen. Nun wurden 5 ml Accutase in die Kulturschale gegeben, um die Zellen vom Boden abzulösen. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten im Brutschrank. Mikroskopisch wurde daraufhin kontrolliert ob alle Zellen vom Boden gelöst waren. Nun wurde das Accutase – Zell – Gemisch in 10 ml Medium aufgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Das Falcon Tube wurde danach auf 30 ml mit Medium aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1600 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt um das Pallet danach mit 10 ml Kulturmedium zu resuspendieren. Als letzten Schritt wurden 10 ml Casy Ton Flüssigkeit mit 50 µl Zellsuspension gemischt und mittels des Casy Zellzählers daraus die Zellzahl ermittelt. Das Kulturmedium wurde entsprechend der Zellzahl (320.000/ml) mit verwendeter Zellsuspension versetzt und konnte auf die jeweiligen Lumox Zellkulturschalen verteilt werden.

3.3.2 Fibrinfixierung boviner Sehnen

Damit die Sehnen für die lange Kultivierungszeit immer mit Medium bedeckt waren, war es nötig, sie am Boden der Zellkulturschale zu fixieren. Ansonsten würden sie in der Flüssigkeit schwimmen und folglich nie komplett von Medium bedeckt sein. Die Fixierung erfolgte mittels eines 2 Komponenten Fibrinklebers: Tissucol Duo S der Firma Baxter. Beide Komponenten des Klebstoffs wurden im Wasserbad aufgetaut und mit einer Pipette in die Lumox Zellkulturschale pipettiert. Von jeder Komponente wurden 5 µl auf den Boden der Lumox Schale, je an zwei Stellen, pipettiert. Anschließend sollte die Sehne mit einer Pinzette vorsichtig angedrückt werden. Da der Kleber schnell aushärtet, war darauf zu achten, die Sehne zügig zu fixieren.

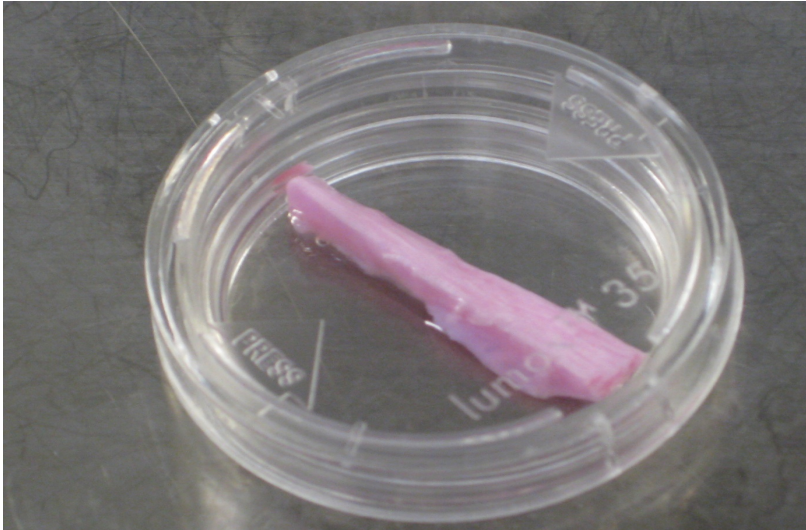


Abbildung 11: bovine Sehne fixiert in Lumox Zellkulturschale

3.3.3 Zellkulturbedingungen

Die Sehnen waren fixiert in einer Lumox Zellkulturschale (Lumox DISH 35 TC-Qualität steril) ohne Deckel, bedeckt von Nährmedium. Jede Lumox Schale wurde einzeln in eine größere Kulturschale mit Deckel (Cellstar Tissue culture dishes 15) gestellt. Hierdurch wurde optimales Handling bei größtmöglicher Sterilität erreicht. Die Kulturschalen befanden sich gestapelt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

3.3.4 Zellkulturversorgung

Die Versorgung der Zellen mit neuem Medium erfolgte alle 48 Stunden. Das BGJ Medium wurde zu Beginn des Versuches nach Rezept (s.o.) angemischt und mit FCS, Penicillin und Streptomycin versetzt.

Bevor es in die Lumox Schalen zu den Sehnen gegeben werden konnte, musste es im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Anschließend wurden 50 µg/ml Gentamicin und 400 ng/ml Vitamin D₃ hinzugegeben. Für diejenigen Gruppen, die eine BMP Applikation erhielten, wurden dem gleichen Medium noch 400 ng/ml an BMP-2 zugefügt.

Einmal pro Woche fand ein Medienwechsel mit FCS freiem Medium statt (gleiche Rezeptur wie oben beschrieben, nur ohne FCS). Dies war für die folgende Analytbestimmung wichtig. Die Zellen wurden diesem Medium nur für 24 Stunden ausgesetzt und anschließend wieder mit FCS haltigem BGJ versorgt.

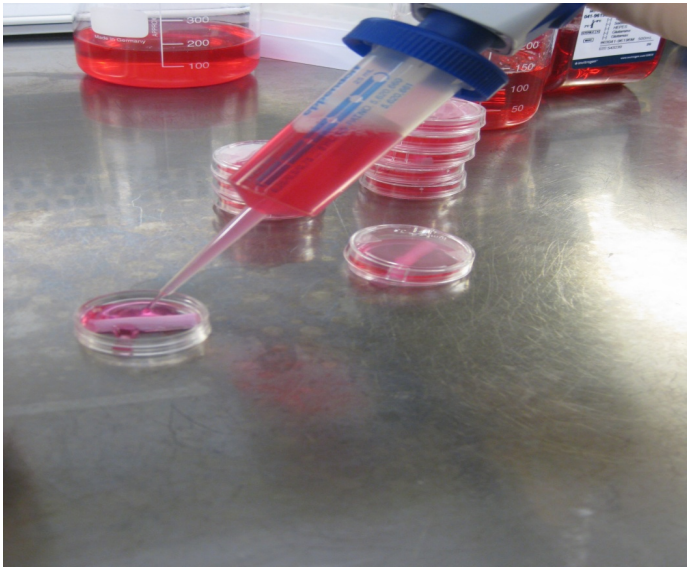


Abbildung 12: Versorgung der Sehnen mit BGJ Medium

3.4 Analytbestimmung aus Medienüberständen

3.4.1 Probenentnahme und Lagerung

Einmal pro Woche wurden Medienüberstände für die spätere Bestimmung der Analyte (Laktat, Laktatdehydrogenase, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin) abpipettiert und in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Für die Bestimmung war es notwendig, dass die Sehnen für 24h in FCS freiem Medium inkubiert wurden. Die Eppendorf Cups wurden bei -80°C gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Analyte

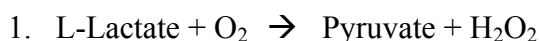
3.4.2.1 Laktat

Das verwendete Laktat Assay stammt von der Firma Roche Diagnostics in Mannheim (Cat.: 11822837 190). Das L-Lactat der Proben bzw. Standards wird über die Laktat Oxidase (LOD) zu Pyruvat oxydiert. Das gebildete H_2O_2 wird von der Peroxidase (POD) genutzt um das farblose 4-Amino-Antipyrin in ein violette Chromogen umzuwandeln. Die Intensität der gebildeten Farbe ist direkt proportional zur

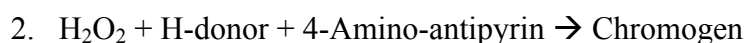
METHODEN

Laktatkonzentration in der Probe. 2 µl Probe bzw. Standard wurden mit 200 µl Reagenz 1 (= 100 µkat/l buffered ascorbate oxidase, ≥ 6 U/ml, H-donor) für 5 min. bei 23°C in polystyrenen F-wells (NUNC, Wiesbaden, Germany) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Reagenz 2 (= 0,2 mg/ml 4-amino-antipyrin (0,98 mM), 50 µkat/l microbial LOD (≥ 3 U/ml), 80 µkat/l horse radish POD ($\geq 4,8$ U/ml)) hinzugefügt und nach 5 min. bei 23°C die Zunahme der Absorption (ΔA) 405 nm mit einem mikrotiterplatten Photometer (Milena; DPC, Los Angeles, USA) gemessen. Der 5 min Reaktionswert wurde mit dem Absorptionswert vor der Zugabe von Reagenz 2 verglichen. Als Standards wurden verwendet: Lyphochek® level 1 und level 2 (BioRad, Irvine, USA), die 4.22 mM bzw. 1.11 mM Laktat enthielten.

LOD



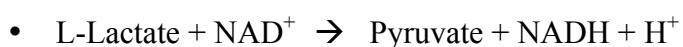
POD



3.4.2.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Der LDH Assay (Warburg-Reaktion) stammt von der Firma Roche Diagnostics, Mannheim (Cat.: 03002098 122). Die LDH der Proben bzw. Standards überträgt H Atome von L-Laktat auf NAD. Das gebildete NADH wurde als ΔA bei 340 nm gemessen. 40 µl Probe bzw. Standard wurden mit 200 µl N-methylglucamin (80 mM, pH 9,4, Temp. 37°C), Lithium Laktat (Reagenz 1, 12,4 mM) und mit 50 µl NAD (Reagenz 2, 12,4 mM) in F-wells (Firma: NUNC) inkubiert. Nach 60 min. bei 23 °C wurde die Zunahme der Absorption (ΔA) 405 nm mit einem mikrotiterplatten Photometer (Tecan Sunrise, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Als Standards wurden verwendet: Lyphochek® level 1 und level 2 (BioRad, Irvine, USA), beide 1:4 verdünnt mit 0,9% NaCl, die dann 40,3 U/l oder 80 U/l LDH enthielten.

LDH



3.4.2.3 *alkalische Phosphatase (ALP)*

Der alkalische Phosphatase (ALP) Assay (pNA-Reaktion) kommt von der Firma Roche Diagnostics in Mannheim, Deutschland (Cat.: 12172933 122). Die ALP der Proben bzw. Standards teilt das pNA-Substrat, sodass gelbliches pNA freigesetzt wird. Das gebildete pNA wurde als ΔA bei 405 nm gemessen. 40 μ l Probe bzw. Standard wurden mit 200 μ l 2-amino-2-methyl-1-propanol (224mM, pH 10,44, 30°C), Magnesium Acetat (0,5mM), Zink Sulfat (0,1mM), Reagenz 1 (= N-(2-Hydroxyethyl)-ethylene-diamine-triacetic, 0,5mM) und mit 50 μ l p-nitrophenylphosphate (pNA-phosphate) (20mM) in F-wells (Firma: NUNC) inkubiert. Nach 30 min. bei 23°C wurde ΔA bei 405 nm mit einem mikrotiterplatten Photometer (Milenia, DPC, Los Angeles, USA) gemessen. Als Standards wurden verwendet: Lyphochek® level 1 und level 2 (BioRad, Irvine, USA), beide 1:4 verdünnt mit 0,9% NaCl, die dann 21,3 U/l oder 75 U/l enthielten.

ALP

- $\text{pNA-Phosphate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{free pNA} + \text{phosphate}$

3.4.2.4 *Osteocalcin (OCN)*

Das Osteocalcin wurde mittels eines Elisas auf einer 96 Well Plate bestimmt. Der Hersteller des Elisas ist die Micro Vue Bone Health Quidel Corporation. Die Pipettierschritte wurden genau nach Anleitung durchgeführt. Anschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung der Extinktion und eine automatische Umrechnung auf die genaue Konzentration des Osteocalcins in der jeweiligen Probe

3.5 Analytbestimmung der Lyse

3.5.1 Probenentnahme

Die Zell Lyse wurde durchgeführt um die löslichen Proteine, die sich in der Zellmembran der kultivierten Zellen befanden, herauszulösen und anschließend messen zu können. Der Fokus lag dabei auf der Bestimmung der alkalische Phosphatase (ALP), die zum größten Teil in der Zellmembran sitzt und daher nicht nur aus dem Medienüberstand gemessen werden sollte. Einmal pro Monat wurden daher von den 3 entnommenen Sehnen aus jeder Gruppe 2 für eine Lyse verwendet.

3.5.2 Aufbereitung

Zuerst wurde das Medium der entnommenen Zellkulturschalen abgesaugt. Es folgte ein Waschvorgang mit PBS. Nachdem das PBS ebenfalls abgesaugt wurde, wurden 2 ml des kalten (6°C) Lyse Puffers über die Sehne in die Kulturschale pipettiert. Anschließend wurden die Lumox Schalen für 10-15 Minuten auf Eis gelagert. Während dieser Zeit wurde mehrmals vorsichtig umgerührt um den gesamten Zellrasen von der Sehne zu lösen und in den Lysepuffer zu ziehen. Die Sehne konnte anschließend in Einbettkassetten überführt und weiter für Histologie und Elektronenmikroskopie bearbeitet werden. Die Suspension aus Lysepuffer und Zellen wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C u. 1600 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für die ALP Analyse abermals in neue Eppendorf Cups überführt und bis zur Bestimmung bei -20°C eingefroren.

3.5.3 Bestimmung der Analyte

Die Analyte ALP, LDH und Laktat wurden analog zu den Methoden unter dem Punkt 3.4.2. bestimmt

3.6 Histologie

3.6.1 Probenentnahme

Nach 4, 8 und 12 Wochen der Versuchslaufzeit wurden jeweils 1/3 der Sehnen pro Gruppe (entspricht 3 Stück) entnommen und für histologische Zwecke aufbereitet.

3.6.2 Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen zur histologischen Präparatgewinnung

Die entnommenen Sehnen wurden in gelabelte Einbettkassetten überführt und zunächst für 24 h in 4%iger Paraformaldehyd Lösung gelagert. Anschließend erfolgte eine Wässerung für abermals 24 Stunden. Danach durchliefen die Sehnen in ihren Einbettkästen folgende Lösungen:

METHODEN

Alkohol 70%	24 h
Alkohol 80%	24 h
Alkohol 90%	24 h
Alkohol 100%	24 h
Xylol 100%	24 h
Xylol 100%	24 h
Xylol Technovit (50:50)	24 h
Xylol Technovit (50:50)	24 h

Die nachfolgenden Schritte/Lösungen fanden jeweils bei 6°C im Kühlschrank statt:

Präinfiltrationslösung 1	24 h
Präinfiltrationslösung 2	24 h
Infiltrationslösung 1	24 h
Infiltrationslösung 2	24 h

3.6.3 Einbettung

Waren diese Schritte durchlaufen, konnte mit der Einbettung begonnen werden. Die Einbettlösung wurde aus Stock Solution A und Stock Solution B im Verhältnis 1:10 hergestellt. Wichtig war, dass die Lösungen gut miteinander gemischt wurden, da die Histologie Blöcke ansonsten porös werden konnten und folglich schlecht zu schneiden waren.

Die Sehnen wurden zusammen mit beschrifteten Filterpapierstreifen in Probenbehälter der Firma Kobe gelegt. Die Probebehälter kamen in Aluminium Blocks. Anschließend wurde die Einbettlösung unter dem Abzug in die Probenbehälter gefüllt. Die Aluminiumblocks kamen mitsamt ihren Probebehältern für 10 Minuten ins Vakuum um kleine Luftbläschen aus der Einbettlösung zu ziehen. Dann wurde auf die Einbett Cups ein Stück Polyethylenfolie gelegt und das Cup mit einem Deckel verschlossen. Nach ca. 5 Tagen im Gefrierschrank bei -13°C waren die Histologie Blöcke ausgehärtet und konnten geschnitten werden.

3.6.4 Herstellung von histologischen Schnitten

Der zu schneidende Block wurde in die Fassung des Mikrotoms eingespannt und zunächst mit einer Dicke von 12 µm angeschnitten. Anschließend wurden Schnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt. Je zwei fertige Schnitte wurden auf einen Superfrost Plus Objektträger gelegt und mit der Streckflüssigkeit benetzt, sodass keine Wellen im Präparat zurückblieben. Eine Polyethylenfolie wurde auf den Objektträger gelegt, damit unter hohem Druck die Flüssigkeit unter der Folie mit einem Stück Zellstoff ausgestrichen werden konnte. Die fertigen Schnitte kamen mit zwischengelagertem Filterpapier aufeinander gestapelt in einen Aluminiumschraubstock und wurden für 3-4 Tage in einem Brutschrank bei 50°C inkubiert. Nun hafteten die Schnitte fest auf dem Objektträger und konnten gefärbt werden.

3.6.5 Färbung von histologischen Schnitten

3.6.5.1 v. Kossa – Stain Färbung

Die modifizierte von Kossa – Stain Färbung wurde gewählt, um eventuelle Kalzifizierungsprozesse sichtbar zu machen, da sich in der von Kossa Färbung die mineralisierten Knorpel – bzw. Knochengewebe braun bis tiefschwarz darstellen. Als Gegenfärbung wird eine Mayer Hämalaun Färbung verwendet. (34)

Als Färbelösungen wurden verwendet:

- Silbernitratlösung 5%ig
- Natriumkarbonat – Formaldehyd- Lösung
- Natriumthiosulfat – Lösung
- Hämalaun Lösung

Färbanleitung:

01	Entblasten in 2- Methoxyethylacetat (MEA)	3x 1h
02	Spülen in Aceton	2x 10 min
03	Spülen in Aqua bidest.	2x 5 min
04	in Silbernitratlösung einstellen	1h

METHODEN

05	Spülen in aqua bidest.	2x 30 sec
06	Reduzieren in Natriumkarbonat - Formaldehyd	8 min
07	Spülen in aqua bidest.	10 min
08	Fixieren in Natriumthiosulfat	5 min
09	Spülen in Leitungswasser	15 min
10	Aqua bidest.	3 min
11	Mayers Hämalan	5 min
12	Bläuen in Leitungswasser	10 min
13	aufsteigende Alkoholreihe (70% 80% 90% 100%)	je 3 min
14	Alkohol 100%	5 min
15	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
16	Eindecken in Entellan	

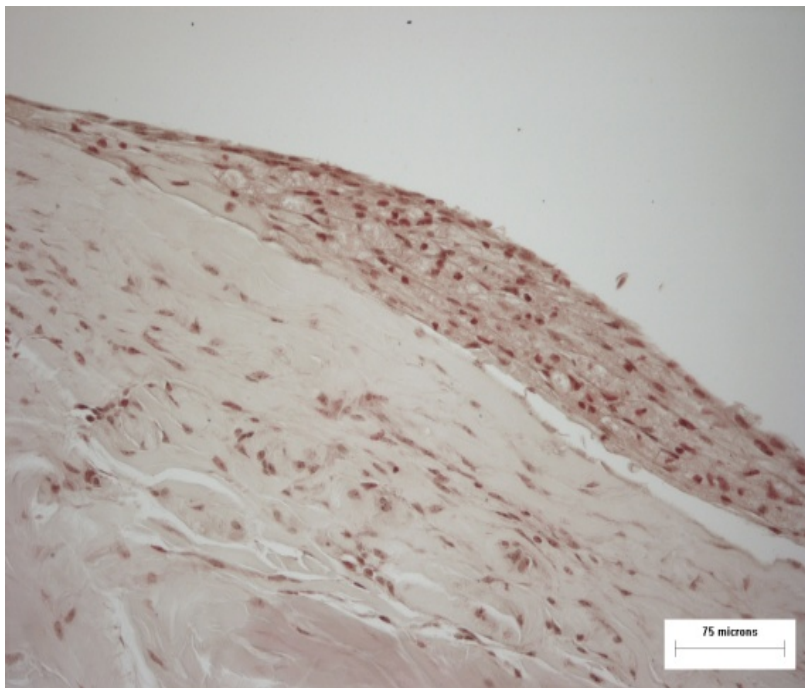


Abbildung 13: van Kossa Färbung eines Sehnenabschnitts (20x Vergrößerung)

3.6.5.2 Alcianblau – PAS Färbung

Mit Hilfe der PAS Färbung können saure Glykosaminoglykane und neutrale Polysaccharide unterschieden werden. Einige Atomgruppen in den Polysacchariden werden durch die Perjodsäure aufgespalten und später zu Aldehyden oxidiert. Die Aldehyde reagieren mit Schiff'schem Reagenz, woraus eine deutliche Rotfärbung

METHODEN

resultiert. Mit der Alcianblau – PAS Färbung kann man folgenden Stoffe nachweisen, jedoch nicht genau untereinander differenzieren:(75)

- Neutrale Glykosaminoglykane
- Muko- und Glykoproteine
- Glykolipide
- ungesättigte Fettsäuren
- Phospholipide

Diese Färbung wurde angewendet um die Vitalität der Zellen in Kultur darzustellen. Sind Zellen aktiv und ist im Nährmedium genug Glukose enthalten, so können diese Zellen Glukose aufnehmen und in Glykogen umbauen. Glykogen dient den Zellen als Energiespeicher. Also kann durch den Glykogengehalt der Zelle passiv ein Rückschluss auf ihre Vitalität geschlossen werden. (75)

Saure Glykosaminoglykane werden blaugrün angefärbt, Zellkerne blau und Glykogen und Glykoproteine stellen sich purpurrot dar.

Färbeanleitung:

01	Entblasten in 2- Methoxyethylazetat (MEA)	3x1 h
02	Spülen in Aceton	2x5 min
03	Spülen in Aqua bidest.	2x3 min
04	Einstellen in Alcianblau Lösung	1 h
05	Spülen in Leitungswasser	5 min
06	Einstellen in Perjodsäure	30 min
07	Spülen in Aqua dest.	5 min
08	Einstellen in Schiff'sches Reagenz	45 min
09	Spülen in Leitungswasser	10 min
10	Einstellen in Hämalun	10 min
11	Bläuen in Leitungswasser	10 min
12	aufsteigende Alkoholreihe (70% 80% 90% 100%)	Je 3 min
13	Alkohol 100%	5 min
14	Dehydratisieren in Xylol	2x5 min
15	Eindecken in Entellan	

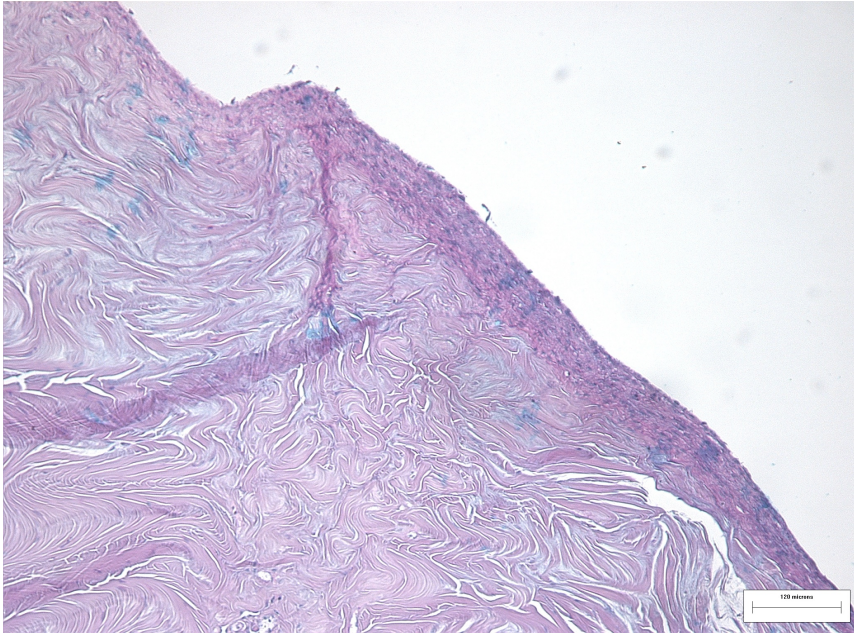


Abbildung 14: Alcianblau PAS Färbung eines Sehnenabschnitts (10x Vergrößerung)
Glykogen färbt sich dunkellila/dunkelblau

3.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

3.7.1 Probenentnahme

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen benötigt man nur relativ kurze Sehnenstücke. Daher wurden von den Sehnen, die der histologischen Aufarbeitung dienten, kleine Stücke (0,5 cm) mit einem Skalpell abgetrennt, nachdem diese für 24h in Paraformaldehyd Lösung standen. Die abgetrennten Sehnenstücke wurden für die REM verwendet.

3.7.2 Fixierung und Aufbereitung boviner Sehnen zur rasterelektronenmikroskopischen Präparatgewinnung

Zunächst mussten die Sehnenstücke primär fixiert werden. Dies geschieht in der Primärfixationslösung für 24 h im Kühlschrank bei 6°C. Anschließend wurden die Sehnen 5 mal mit REM Puffer gewaschen und danach in diesem belassen, bis sie für die Sekundärfixation benötigt wurden.

Zur Sekundärfixation wurden die Sehnen zunächst für 4h in Osmiumtetroxid eingelegt und anschließend 5-10 mal mit Aqua dest. gewaschen. Danach durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe (70% → 80% → 90% → 100%) (pro Alkohol 2h) um abschließend noch 2-3

mal mit Aceton gewaschen zu werden (2h/Aceton). Anschließend waren die Sehne bereit für die Critical Point Kammer. (16)

3.7.3 Critical Point Kammer (CPK)

In der Critical Point Kammer wurde den Sehnen auch noch der letzte Rest an Flüssigkeit entzogen, damit eine spätere elektronenmikroskopische Betrachtung möglich war. Die Sehnen wurden in spezielle Körbchen gelegt und kamen anschließend in die CPK, die soweit mit Aceton befüllt wurde, dass die Sehnen gerade eben bedeckt waren. Es folgten Austauschvorgänge zwischen CO₂ und Aceton, bis das gesamte Aceton durch CO₂ ersetzt worden war. Anschließend wurde die Kammer solange aufgeheizt, bis bei bestimmten Temperatur- und Druckwerten der kritische Punkt erreicht worden war. Der Druck konnte nun abgelassen und die Sehne aus der CPK entfernt werden. (16)

3.7.4 Sputter Coater

Als letzten Schritt vor der mikroskopischen Beurteilung mussten die Sehnen mit Gold bedampft werden, was im Sputter Coater geschah.

3.7.5 Erstellen von rasterelektronenmikroskopischen Bildern

Nach Abschluss der Vorbehandlung der Sehnenpräparate konnten diese im REM betrachtet und anschließend Bilder angefertigt werden.

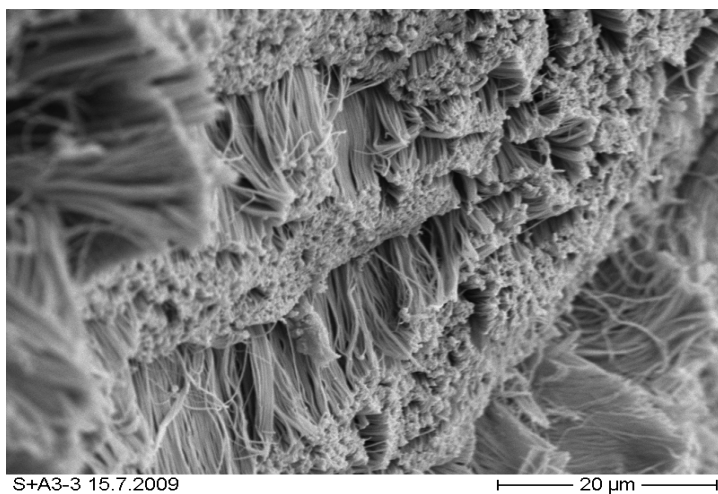


Abbildung 15: REM Aufnahme einer Sehne im Querschnitt

3.8 Zusatzversuch

3.8.1 Grundzüge des Versuchs

Dieses Zusatzexperiment wurde durchgeführt, um die Wirkung von BMP direkt auf die unterschiedlichen Zellarten, die sich in unserem Hauptexperiment befanden, auszutesten. Es wurden insgesamt 6 Gruppen gebildet, die anschließend analysiert worden sind:

- Gruppe 1: Osteoblasten mit BMP Applikation
- Gruppe 2: Osteoblasten ohne BMP Applikation
- Gruppe 3: Fibroblasten mit BMP Applikation
- Gruppe 4: Fibroblasten ohne BMP Applikation
- Gruppe 5: Osteoblasten/Fibroblasten Mischkultur (80:20) mit BMP Applikation
- Gruppe 6: Osteoblasten/Fibroblasten Mischkultur (80:20) ohne BMP Applikation

Für jede Gruppe wurden zwölf 6 Well Plates verwendet. Sechs Plates bekamen alle 48 Stunden BMP appliziert, die sechs anderen Plates liefen als Kontrollen nebenher. Ein Medienwechsel erfolgte alle 48 Stunden (Das Medium aller 6 well plates wurde alle 4 Tage gesammelt, um später hieraus ALP, LDH u. Laktat zu bestimmen). Nach 4 Tagen verließ eine 6 Well Plate pro Gruppe den Versuch und durchlief eine Lyse. Aus dem Zell Lysat wurde anschließend mittels der bereits beschriebenen Methodik die alkalische Phosphatase (ALP) bestimmt.

3.8.2 Aufbereitung und Lyse

Alle 4 Tage verließ eine 6 Well Plate aus jeder Gruppe den Versuch und durchlief eine Lyse.

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, dann mit 0,5 ml Accutase unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst und schließlich in 2ml (+1,5ml) BGJ- Medium aufgenommen.

Danach wurden sie für 10 min. bei 1600 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml eiskaltes PBS aufgenommen. Es folgte die Lagerung der Zellsuspension auf Eis.

METHODEN

Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 1600 U/min., der Überstand wurde abgesaugt und zum Pellet wurden 0,5 ml Lysepuffer gegeben. Der Puffer sollte für 30 min. unter Manipulation auf Eis einwirken. Anschließend folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 14000 U/min. Der Überstand musste in ein Eppendorf Cup aufgenommen werden und konnte dann für die Bestimmung der ALP bei -20°C eingefroren werden.

3.8.3 Bestimmung von alkalischer Phosphatase

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase erfolgte aus den Überständen der löslichen Proteine analog zu der Bestimmung im Hauptversuch (siehe Punkt: 3.4.2.3)

3.8.4 Bestimmung von Analyten aus Medienüberständen

Zusätzlich wurde alle 4 Tage das Medium von allen 6 Well Plates gesammelt und für spätere Bestimmungen in 50 ml Falcon Tubes überführt. Die Tubes wurden bei -80°C tiefgefroren, bis aus ihnen ebenfalls die Analyte LDH, Laktat und ALP bestimmt werden konnten (siehe Punkt: 3.4.2.)

3.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen/Aktivitäten der jeweiligen Analyte (ALP, OCN, LDH, Laktat) berechnet. Um bei den Stichproben eine Aussage über signifikante Konzentrationsunterschiede treffen zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei einem $p < 0,05$ waren die Konzentrationsunterschiede als signifikant anzusehen. Zur Berechnung wurden die Programme: Microsoft® Excel® 2008 für Mac und SPSS® 12.0 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Analytbestimmung Hauptversuch

4.1.1 Analyte aus Medienüberständen

Die Medienüberstände aus den Zellkulturschalen wurden jede Woche zur späteren Bestimmung der Analyte eingefroren. Einen Tag vor der Probenentnahme wurde ein Medienwechsel mit FCS freiem Medium durchgeführt, sodass die Sehnen genau für 24 Stunden in FCS freiem Medium kultiviert waren. Anschließend haben wir die Analyte ALP, LDH, Laktat und Osteocalcin bestimmt. In den folgenden Grafiken wurden jeweils die Mittelwerte der Proben gegeneinander aufgetragen.

Wie bereits unter 3.1. beschrieben, sind folgende Gruppen gebildet worden:

- Gruppe 1: Sehnen mit POB Aussaat (S+A) mit BMP 2 Applikation
- Gruppe 2: Sehnen mit POB Aussaat (S+A) ohne BMP 2 Applikation
- Gruppe 3: Sehnen ohne POB Aussaat mit BMP 2 Applikation
- Gruppe 4: Sehnen ohne POB Aussaat ohne BMP 2 Applikation

4.1.1.1 Alkalische Phosphatase (ALP):

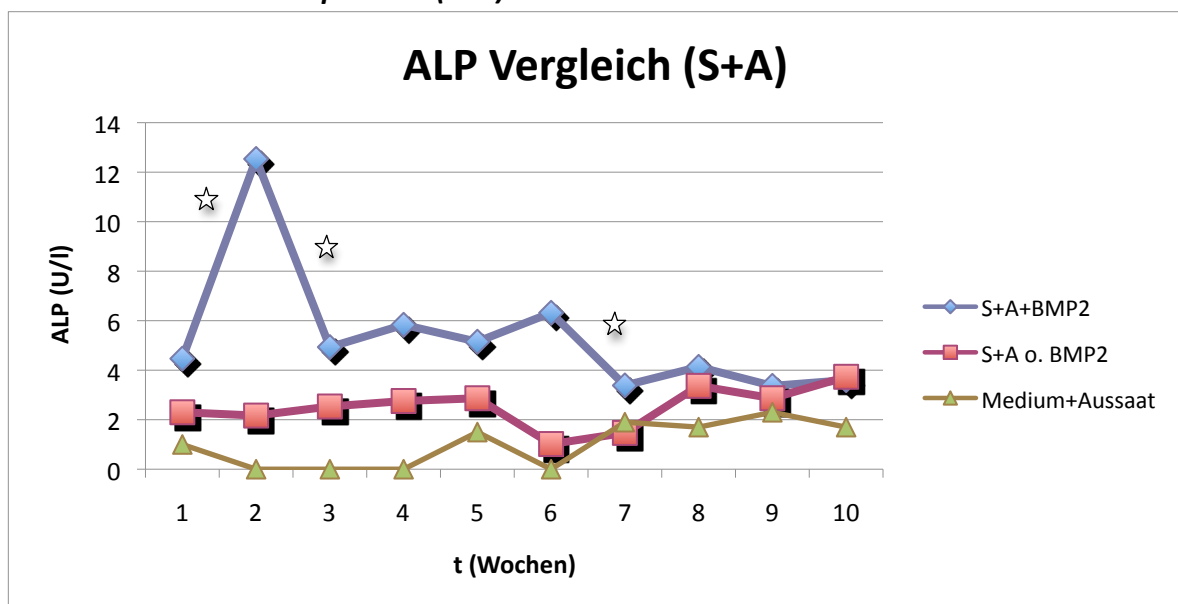


Abbildung 16: ALP Aktivitätsvergleich zwischen Gruppe 1 und 2, signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)

ERGEBNISSE

In dieser Grafik wird der Unterschied in den ALP-Konzentrationen zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 (mit bzw. ohne BMP-Applikation) über einen Zeitraum von 10 Wochen aufgezeigt. Die eine Gruppe (blau) erhielt alle 48 Stunden eine BMP-Applikation, die andere Gruppe (rot) erhielt keine BMP-Applikation. In alle Kulturschalen beider Gruppen wurden zu Beginn der Versuchslaufzeit eine definierte Anzahl an POBs ausgesät (A = Aussaat) (320.000/ml). Als Kontrolle werden die ALP Werte des reinen Mediums (ohne Sehne) mit Osteoblasten Aussaat (grün) aufgezeigt.

Die ALP-Konzentration der Gruppe mit BMP-2 Stimulation (Gruppe 1) war beinahe über den gesamten Zeitverlauf höher als die ALP-Konzentrationen der Gruppe ohne BMP-Applikation. Ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) der ALP-Konzentration konnte in der BMP stimulierten Gruppe in der 2. Versuchswoche beobachtet werden, während dieser Effekt in der Gruppe ohne BMP-Stimulation ausblieb. Bereits ab der 6. Woche kam es trotz BMP-Applikation zu einem kleinen Gefälle in der ALP-Konzentration ($p = 0,025$). Ab der achten Woche gleichen sich die ALP-Konzentrationen aller Gruppen an und verlaufen auf annähernd dem selben Niveau.

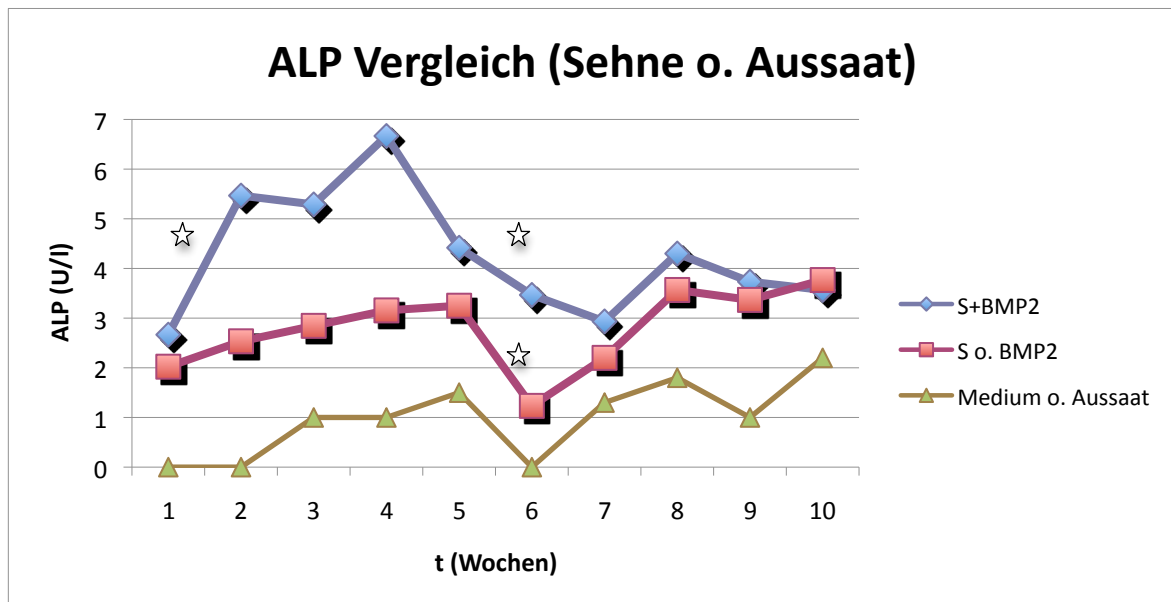


Abbildung 17: ALP Aktivitätsvergleich zwischen Gruppe 1 und 2, signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)

Analog zu Abbildung Nummer 16 werden hier die Mittelwerte der Medienproben ohne POB Aussaat verglichen. Es ist ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Gruppe mit BMP-Applikation in den ersten 2 Wochen zu erkennen ($p = 0,01$). Dem Anstieg folgt

ERGEBNISSE

allerdings ein drastischer Konzentrationsabfall zwischen Woche 4 und Woche 7 ($p = 0,007$). Beinahe parallel hierzu, jedoch auf einem geringeren Konzentrationsniveau, verläuft die Kurve der Gruppe ohne BMP-2 Applikation.

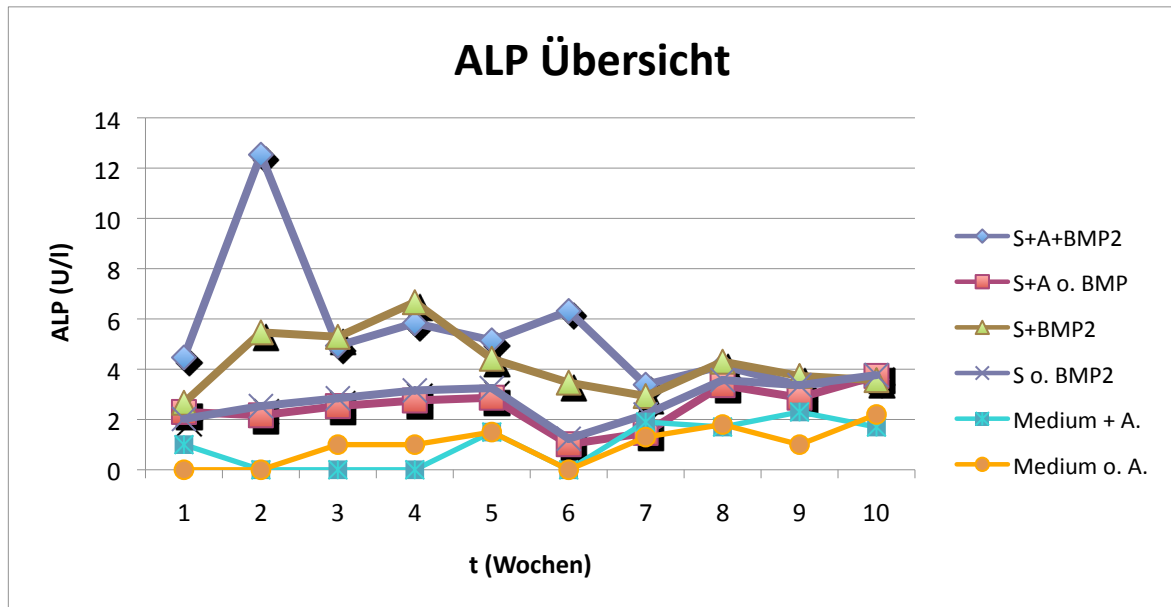


Abbildung 18: ALP Aktivitätsvergleich aller Gruppen (1-4)

Abbildung 18 gibt eine Übersicht über alle eben beschriebenen Gruppen. Es ist zu sehen, dass die beiden Graphen, die BMP erhielten (blau, grün), vor allem in den Wochen 1- 4 über dem Niveau der anderen Graphen verlaufen. Spätestens ab Woche 7 sind kaum noch Unterschiede auszumachen. Als Kontrolle dient das reine Kulturmedium, einmal mit und einmal ohne POB Aussaat

ERGEBNISSE

In Tabelle 5 sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) zu den einzelnen Messzeitpunkten aufgeführt.

ALP	S+A+BMP		ALP	S + BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	4,47	1,81	Woche 1	2,67	0,93
Woche 2	12,53	2,21	Woche 2	5,47	2,72
Woche 3	4,93	0,55	Woche 3	5,29	1,62
Woche 4	5,83	1,48	Woche 4	6,67	3,09
Woche 5	5,15	1,96	Woche 5	4,42	1,40
Woche 6	6,32	2,33	Woche 6	3,47	1,57
Woche 7	3,38	0,33	Woche 7	2,93	0,47
Woche 8	4,13	0,84	Woche 8	4,30	0,70
Woche 9	3,37	0,51	Woche 9	3,73	0,50
Woche10	3,6	0,72	Woche 10	3,57	1,31

ALP	S+A o. BMP		ALP	S o. BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	2,3	0,61	Woche 1	2,02	1,02
Woche 2	2,17	0,91	Woche 2	2,53	0,74
Woche 3	2,53	0,62	Woche 3	2,84	0,72
Woche 4	2,76	0,84	Woche 4	3,16	0,99
Woche 5	2,87	0,45	Woche 5	3,25	0,79
Woche 6	1,02	0,27	Woche 6	1,23	0,68
Woche 7	1,47	0,26	Woche 7	2,20	0,51
Woche 8	3,37	0,8	Woche 8	3,57	0,51
Woche 9	2,87	0,3	Woche 9	3,37	0,67
Woche10	3,73	0,6	Woche 10	3,77	0,93

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der ALP-Werte

4.1.1.2 *Osteocalcin (OCN):*

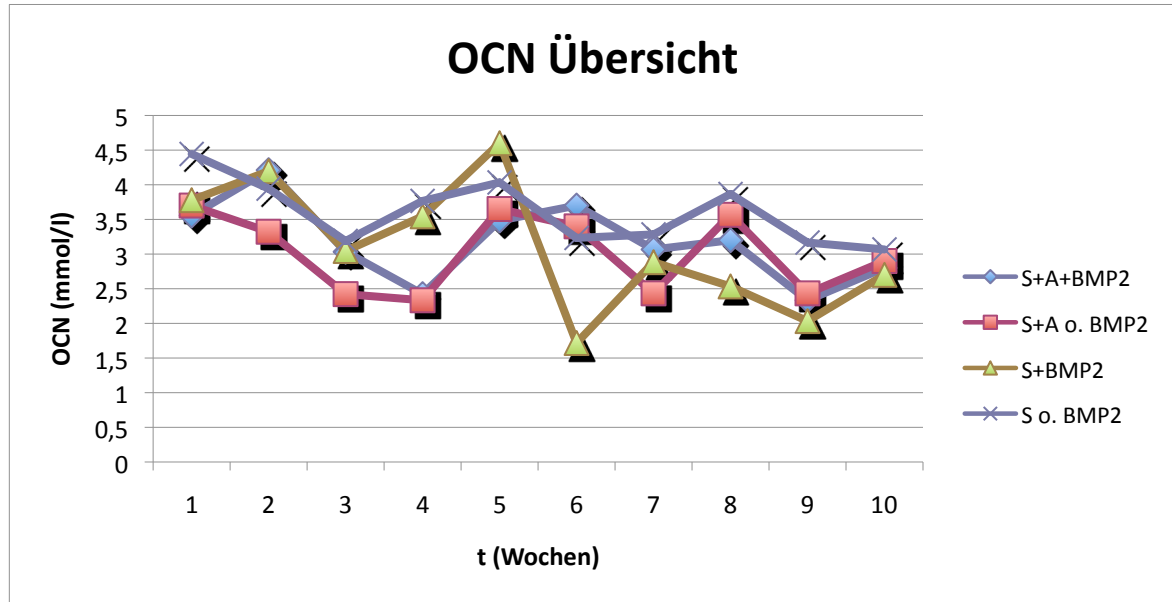


Abbildung 19: OCN Konzentrationsvergleich aller Gruppen (1-4)

Auf dieser Abbildung ist eine Übersicht der Osteocalcin (OCN) Konzentrationen aller Gruppen zu sehen. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer OCN-Konzentration. Der Kurvenverlauf ist inhomogen und bewegt sich zwischen den Werten 4,6 und 1,7 mmol/l.

ERGEBNISSE

Analog zu Tabelle 5 werden im Folgenden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Osteocalcin Konzentrationen aufgeführt.

OCN	S+A+BMP		OCN	S+BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	3,56	1	Woche 1	3,78	0,75
Woche 2	4,21	1,1	Woche 2	4,2	1,46
Woche 3	3,03	1,2	Woche 3	3,04	1,78
Woche 4	2,42	1,33	Woche 4	3,54	0,99
Woche 5	3,48	0,93	Woche 5	4,6	1,4
Woche 6	3,7	1,33	Woche 6	1,72	0,64
Woche 7	3,07	0,5	Woche 7	2,88	0,44
Woche 8	3,2	0,46	Woche 8	2,53	0,38
Woche 9	2,33	0,57	Woche 9	2,03	0,42
Woche 10	2,8	0,82	Woche 10	2,7	0,75

OCN	S+A		OCN	S	
	o. BMP	STABW		o. BMP	STABW
Woche 1	3,7	1,61	Woche 1	4,44	1,69
Woche 2	3,32	0,57	Woche 2	3,94	1,45
Woche 3	2,42	1,02	Woche 3	3,19	1,28
Woche 4	2,33	0,99	Woche 4	3,77	1,59
Woche 5	3,65	0,62	Woche 5	4,03	0,83
Woche 6	3,4	1,82	Woche 6	3,23	0,87
Woche 7	2,43	0,61	Woche 7	3,28	1,12
Woche 8	3,57	2,42	Woche 8	3,87	0,61
Woche 9	2,43	0,25	Woche 9	3,17	1,17
Woche 10	2,9	0,44	Woche 10	3,07	1,26

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der OCN-Werte

ERGEBNISSE

4.1.1.3 Laktatdehydrogenase (LDH):

In Abbildung 20 sind die Aktivitäten der Laktatdehydrogenase der einzelnen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Es lässt sich zunächst ein relativ ähnlicher Verlauf der LDH-Aktivitäten aller Gruppen feststellen. Zwischen Woche 4 und 5 ist ein deutlicher Einbruch in der LDH zu erkennen. In diesem Zeitabschnitt werden die tiefsten Werte der gesamten Versuchslaufzeit erreicht. Ab Woche 5 steigt die LDH-Aktivität aller Gruppen wieder an. Am deutlichsten ist die in Gruppe 1 (+POB+BMP) auszumachen.

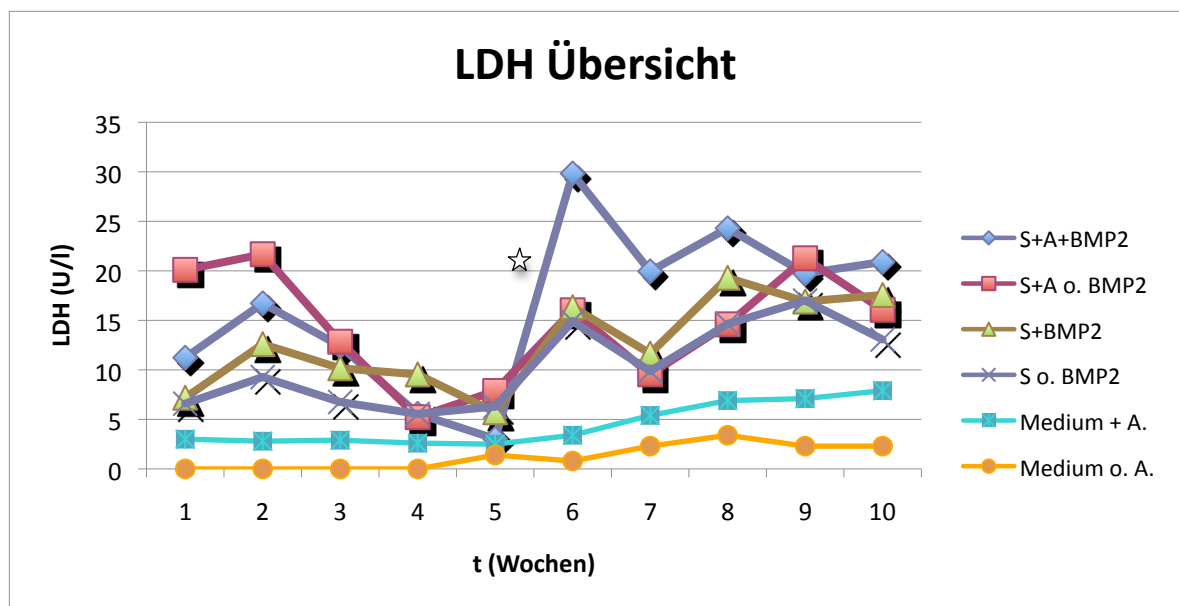


Abbildung 20: LDH Konzentrationsvergleich aller Gruppen (1-4), signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)

ERGEBNISSE

Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 7 aufgezeigt:

LDH	S+A+BMP		LDH	S+BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	11,23	1,34	Woche 1	7,19	2,34
Woche 2	16,72	2,65	Woche 2	12,60	1,76
Woche 3	12,40	1,68	Woche 3	10,17	2,50
Woche 4	5,57	1,81	Woche 4	9,54	2,82
Woche 5	3,03	1,58	Woche 5	5,72	2,72
Woche 6	29,83	2,16	Woche 6	16,33	2,57
Woche 7	19,95	1,89	Woche 7	11,65	1,79
Woche 8	24,30	0,75	Woche 8	19,30	1,35
Woche 9	19,73	1,05	Woche 9	16,90	1,28
Woche 10	20,90	2,29	Woche 10	17,57	1,25

LDH	S+A o. BMP		LDH	S o. BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	20,10	3,22	Woche 1	6,59	1,98
Woche 2	21,68	1,85	Woche 2	9,28	2,10
Woche 3	12,84	2,20	Woche 3	6,76	2,04
Woche 4	5,22	1,69	Woche 4	5,56	1,97
Woche 5	7,87	1,78	Woche 5	6,30	0,77
Woche 6	16,02	1,81	Woche 6	14,90	2,07
Woche 7	9,55	1,04	Woche 7	9,87	1,75
Woche 8	14,60	1,18	Woche 8	14,63	1,38
Woche 9	21,27	0,93	Woche 9	17,00	0,36
Woche 10	16,07	1,07	Woche 10	13,07	2,23

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der LDH-Werte

4.1.1.4 Laktat:

In Abbildung 21 ist eine Übersicht über die Entwicklung der Laktatkonzentrationen im Medium gegeben. In allen vier Gruppen ist die Laktatkonzentration über 10 Wochen annähernd gleich. Die höchsten Werte werden in den ersten 2 Wochen erreicht. Es folgt ein kurzer Einbruch der Konzentrationen, die sich zwischen Woche 5 und 7 noch einmal steigern um daraufhin kontinuierlich abzusinken. Die Konzentrationen bewegen sich zwischen 8 und 16 mmol/l. Im Vergleich dazu bleiben die Laktatwerte der Medienproben (türkis, orange) auf einem konstant niedrigeren Niveau um die 6 mmol/l

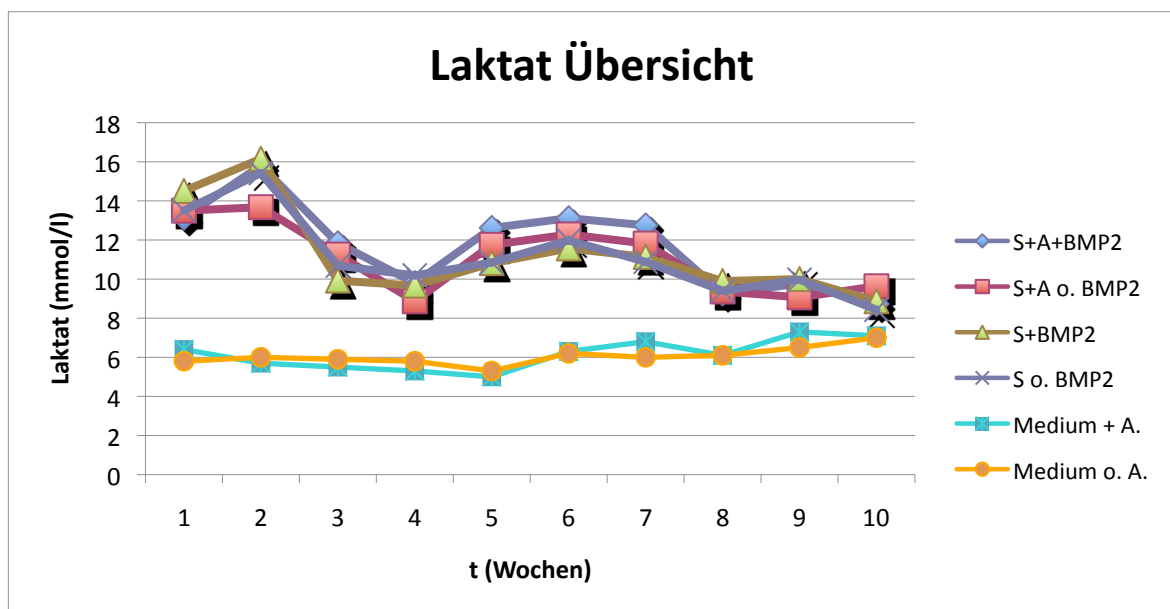


Abbildung 21: Laktat Konzentrationsvergleich aller Gruppen (1-4)

ERGEBNISSE

Tabelle 8 gibt auch hier die Mittelwerte und Standardabweichungen an:

Laktat	S+A+BMP		Laktat	S+BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	13,14	1,19	Woche 1	14,51	1,2
Woche 2	15,81	2,41	Woche 2	16,16	1,31
Woche 3	11,83	1,02	Woche 3	9,92	0,94
Woche 4	9,8	1,84	Woche 4	9,67	1,35
Woche 5	12,62	1,1	Woche 5	10,81	1,29
Woche 6	13,12	0,44	Woche 6	11,57	1,76
Woche 7	12,75	1,32	Woche 7	11,13	1,36
Woche 8	9,27	1,12	Woche 8	9,9	1,61
Woche 9	9,77	0,49	Woche 9	10	0,82
Woche 10	8,73	0,12	Woche 10	8,87	0,49

Laktat	S+A o. BMP		Laktat	S o. BMP	
	MW	STABW		MW	STABW
Woche 1	13,5	1,16	Woche 1	13,5	1,17
Woche 2	13,68	2,82	Woche 2	15,42	2,19
Woche 3	11,26	1,07	Woche 3	10,69	1,02
Woche 4	8,87	1,83	Woche 4	10,19	0,78
Woche 5	11,75	1,37	Woche 5	10,85	0,79
Woche 6	12,28	1,46	Woche 6	11,98	0,98
Woche 7	11,82	0,4	Woche 7	10,89	1,83
Woche 8	9,37	0,7	Woche 8	9,4	0,46
Woche 9	9,07	0,25	Woche 9	9,97	0,74
Woche 10	9,63	0,61	Woche 10	8,43	1,27

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Laktat Werte

4.1.2 Analyte aus Lyse:

4.1.2.1 Alkalische Phosphatase (ALP):

Die alkalische Phosphatase ist ein zellmembrangebundenes Enzym und wird nicht komplett an das Kulturmedium abgegeben. Daher wurde alle 4 Wochen eine Lyse von je 2 Proben einer Gruppe durchgeführt, um das gebundene Enzym aus der Zellmembran herauszulösen. Anschließend konnte aus diesem Lysat die ALP-Konzentration bestimmt werden.

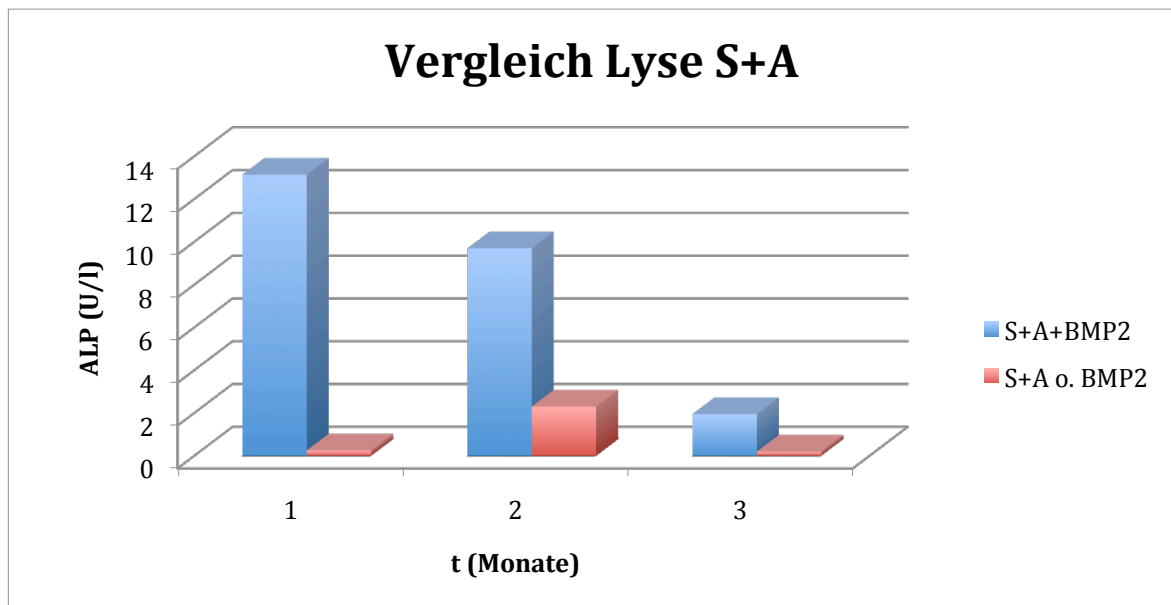


Abbildung 22: ALP Aktivitätsvergleich der Zelllyse (Gruppen 1 und 2)

Abbildung 22 zeigt die ALP-Werte der Lyse nach einem, zwei und drei Monaten. Im direkten Vergleich stehen Gruppe 1 (mit BMP/blau) und Gruppe 2 (ohne BMP/rot). Es ist zu erkennen, dass die ALP-Konzentration der Gruppe 1 über den Werten der Gruppe 2 liegt. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n=2$) sind diese Unterschiede jedoch nicht als signifikant anzusehen ($p > 0,05$). Die ALP-Konzentrationen nehmen in Gruppe 1 stetig ab und erreichen ihren minimalen Wert im 3. Monat. Die ALP-Konzentrationen der Gruppe 2 sind im ersten und dritten Monat sehr gering und haben ihren Spitzenwert mit ca. 2,3 U/l im 2. Monat.

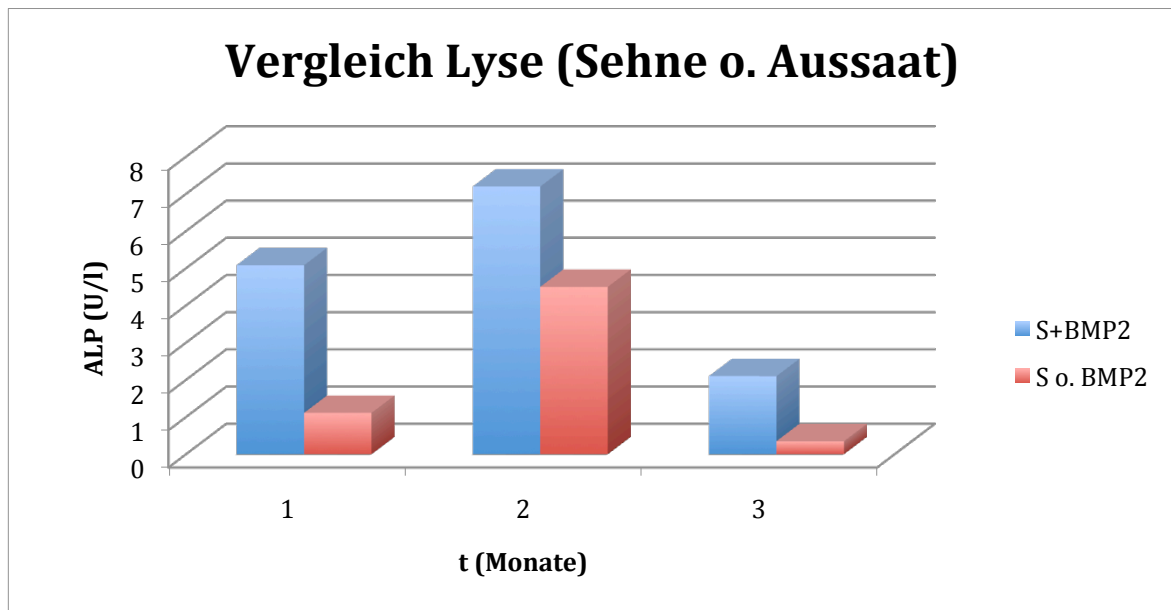


Abbildung 23: ALP Aktivitätsvergleich der Zelllyse (Gruppen 3 und 4)

Analog zu den ALP-Messungen im Medienüberstand, werden auch hier die Gruppen 3 und 4 gegenübergestellt. Man kann abermals erkennen, dass die Gruppe mit BMP (blau) höhere ALP-Werte zu allen drei Messzeiten erzielt, als die Gruppe ohne BMP-Zugabe (rot). Die Unterschiede fallen hier nicht so deutlich aus wie in den Gruppen 1 und 2 (Abb.: 22). Aufgrund der zu geringen Fallzahl ist ebenfalls nicht von signifikanten Unterschieden auszugehen ($p > 0,05$).

4.2 Histologie und Rasterelektronenmikroskopie (REM)

4.2.1 Histologie

Die histologischen Ergebnisse sind in zwei Abschnitte gegliedert. In den Abbildungen 24-26 wird je ein Bild pro Gruppe zu den unterschiedlichen Analysezeitpunkten (1. Monat / 2. Monat / 3. Monat) gezeigt. Die darauf folgenden vier Abbildungen (27-30) behandeln die einzelnen Gruppen separat.

4.2.1.1 Vergleiche nach Kultivierungszeit

Monat 1

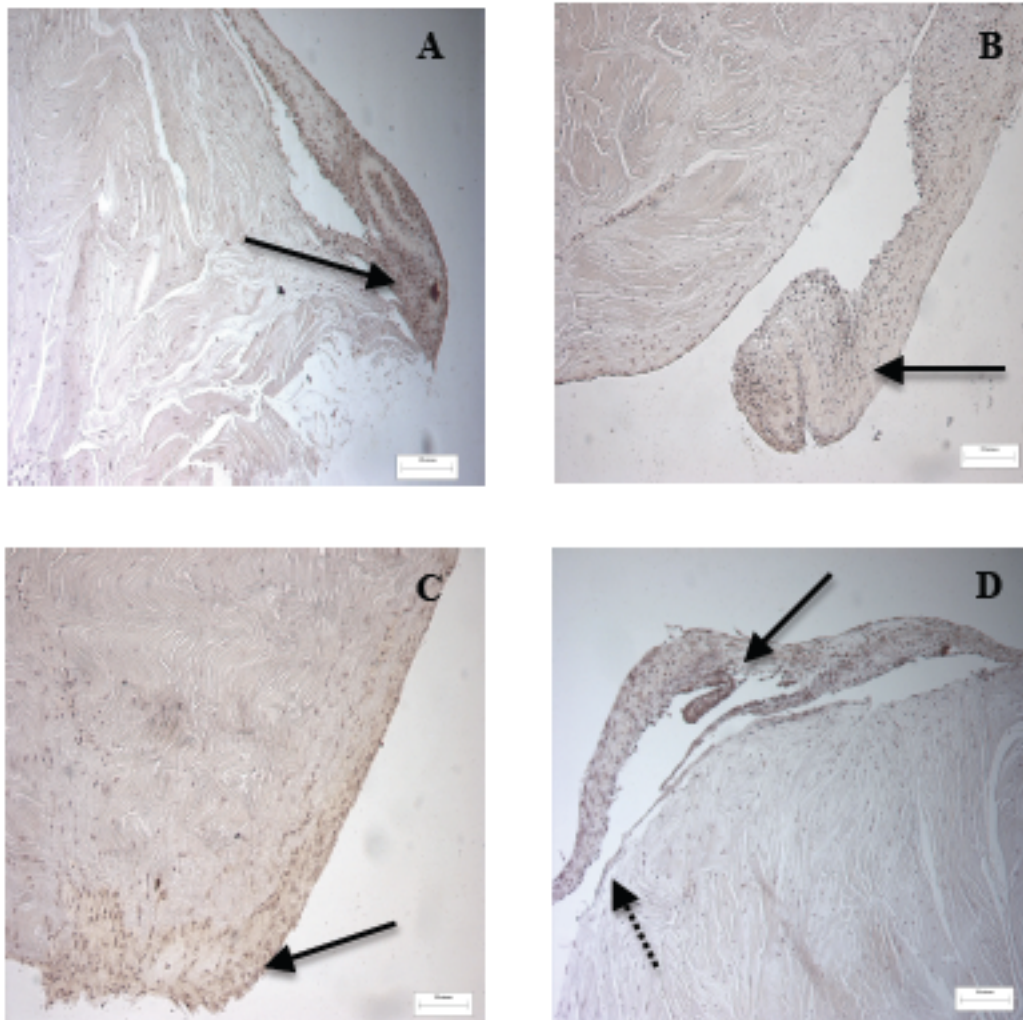


Abbildung 24: Histologie: Vergleich je einer Sehne der Gruppen 1-4 nach 4 Wochen Kultivierung (Kossa Färbung, 10x Vergrößerung)

ERGEBNISSE

A) Sehne + Aussaat + BMP-2 Applikation: In dieser Kossa Färbung sieht man einen neuen, an die Sehne angewachsenen Abschnitt mit hohem Zellanteil (Pfeil). Ein dunkel gefärbter Herd ist im rechten Bildabschnitt zu erkennen. Hier könnte es sich bereits um einen ersten Kalkherd handeln, was in den höheren Vergrößerungen (s.u.) noch deutlicher wird. Je weiter man von der Randzone zur Mitte der Sehne blickt, desto höher wird der Faseranteil auf Kosten des Zellanteils. Zusammenfassend lässt sich auf dieser Abbildung also ein hohes Zellaufkommen im Randbereich der Sehne darstellen, in dessen unterem Abschnitt man bereits ein verkalktes Areal vermuten kann.

B) Sehne + Aussaat ohne BMP-2 Applikation: Analog zu Bild A erkennt man auch in dieser Abbildung einen neu gebildeten Abschnitt mit hohem Zellaufkommen (Pfeil). Verkalkungen sind keine auszumachen. Am Rand des Hauptsehnenstücks findet man lediglich einen sehr dünnen Zellrasen.

C) Sehne ohne Aussaat + BMP-2 Applikation: Im Vergleich zu Bild B, kann man hier eine breite Randzone mit neu gebildeten Zellen erkennen. Im unteren Teil sieht man, wie diese Zellen in die Sehnenmitte einzuwachsen scheinen (Pfeil).

D) Sehne ohne Aussaat ohne BMP-2 Applikation: wie in A und B beschrieben sind auch hier neu gebildete Zellansammlungen zu erkennen (Pfeil). Verkalkungen finden sich nicht. Im Hauptsehnenstück lässt sich nur ein ganz dünner Zellsaum erkennen (gestrichelter Pfeil).

Monat 2

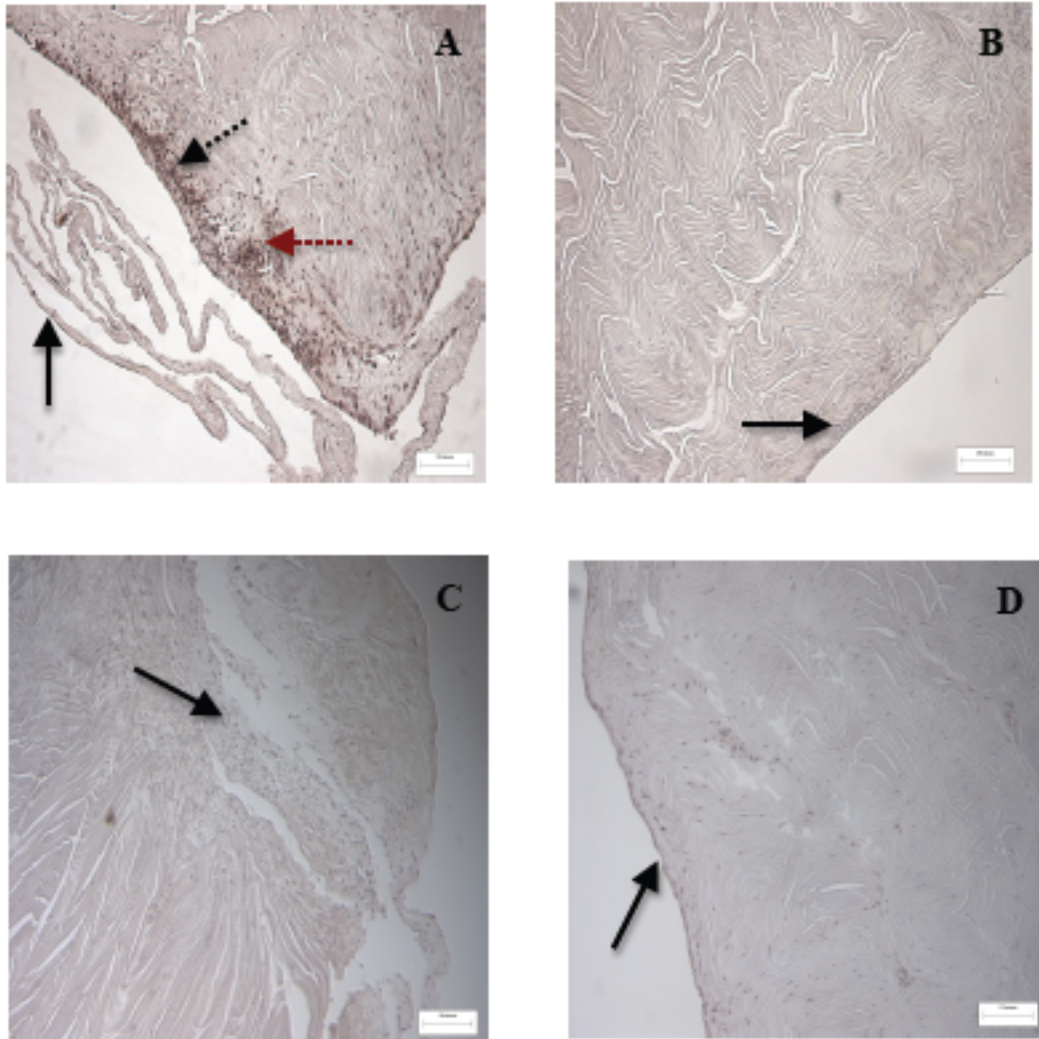


Abbildung 25: Histologie: Vergleich je einer Sehne der Gruppen 1-4 nach 8 Wochen Kultivierung (Kossa Färbung, 10x Vergrößerung)

A) Sehne + Aussaat +BMP-2 Applikation: Eine Ansammlung neu gebildeter extrazellulärer Matrix ist im linken unteren Bildrand zu erkennen (Pfeil). Auch im Hauptsehnenstück sind imposante Zellvermehrungen auszumachen (gestrichelter Pfeil). In der Bildmitte befindet sich ein Zellhaufen (Nodule) (rot gestrichelter Pfeil).

B) Sehne + Aussaat ohne BMP-2 Applikation: Ein großer Ausschnitt der Sehne ist zu erkennen. Man sieht keine extrazelluläre Matrix und am Sehnenrand nur sehr geringe Zellanlagerungen (Pfeil).

ERGEBNISSE

C) Sehne ohne Aussaat + BMP-2 Applikation: Dieses Sehnenstück ist durch den Einbettvorgang in der Mitte leicht auseinandergerissen. Man kann in diesem Stück jedoch eine Menge an neu gewachsenen Zellen erkennen. Je näher man dem Zentrum der Sehne kommt (im Bild: unten), desto weniger Zellen werden sichtbar.

D) Sehne ohne Aussaat ohne BMP-2 Applikation: In der Bildmitte zeigt sich die blande Sehnenstruktur mit sehr wenigen Zellkörpern. Am Sehnenrand befindet sich ein dünner Zellrasen (Pfeil).

Monat 3:

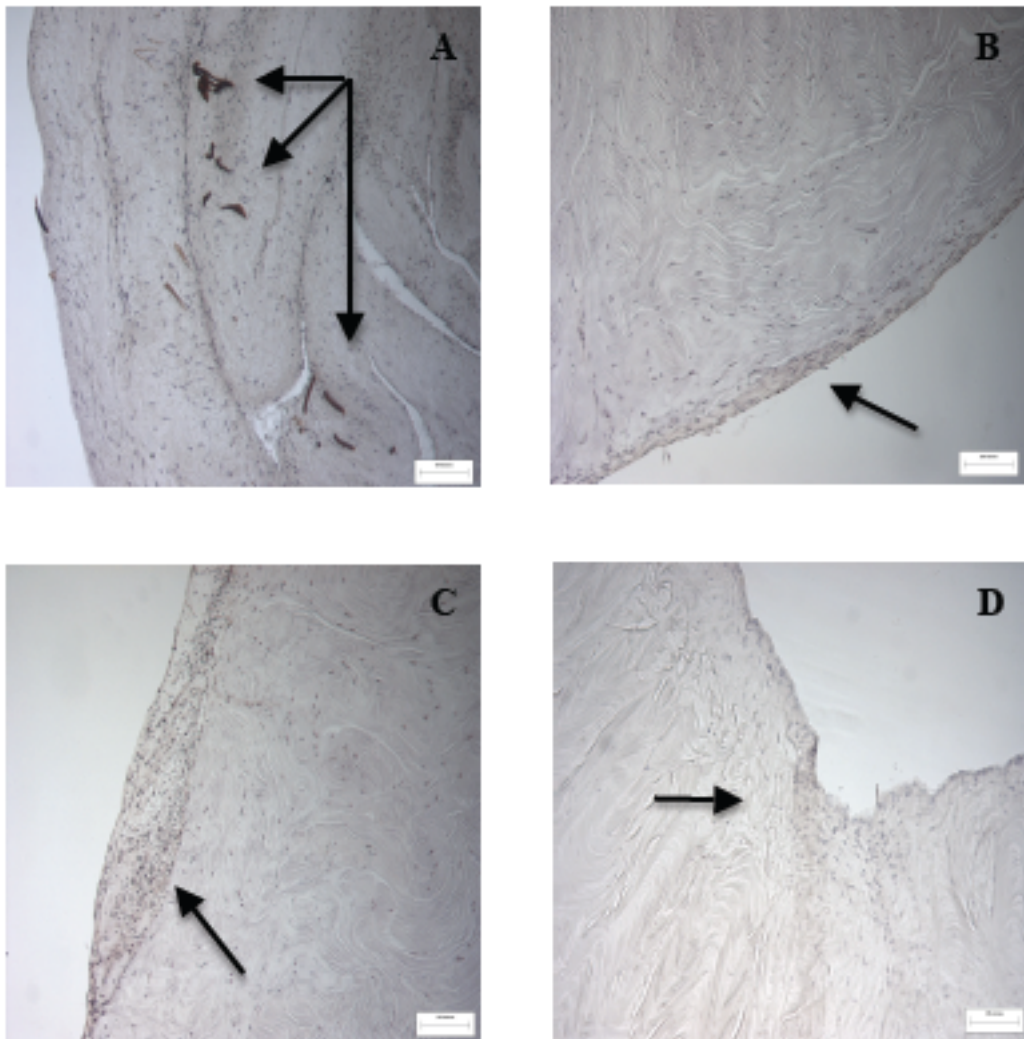


Abbildung 26: Histologie: Vergleich je einer Sehne der Gruppen 1-4 nach 12 Wochen Kultivierung (Kossa Färbung, 10x Vergrößerung)

ERGEBNISSE

A) Sehne + Aussaat + BMP-2 Applikation: Der Fokus dieses Bildes liegt auf den dunkelbraun bis schwarz eingefärbten Herden, die in die Sehnenoberfläche eingebaut sind und verschiedene Kalzifizierungsprozesse darstellen könnten.

B) Sehne + Aussaat ohne BMP-2 Applikation: Der Sehnenrand zeigt einen dünnen Zellsaum mit nur wenigen braun gefärbten Zellen. Es sind keine Kalzifizierungsprozesse auszumachen.

C) Sehne ohne Aussaat + BMP-2 Applikation: Ein großer neu gewachsener Sehnenanteil mit zahlreichen dunkel gefärbten Zellkernen ist hier zu sehen (Pfeil).

D) Sehne ohne Aussaat ohne BMP-2 Applikation: wenige Zellen sind in der Mitte des Bildes zu erkennen. Hier wachsen sie in die Tiefe der Sehne (Pfeil).

4.2.1.2 Vergleiche nach Behandlungsart:

Sehne + Aussaat + BMP-2 Applikation

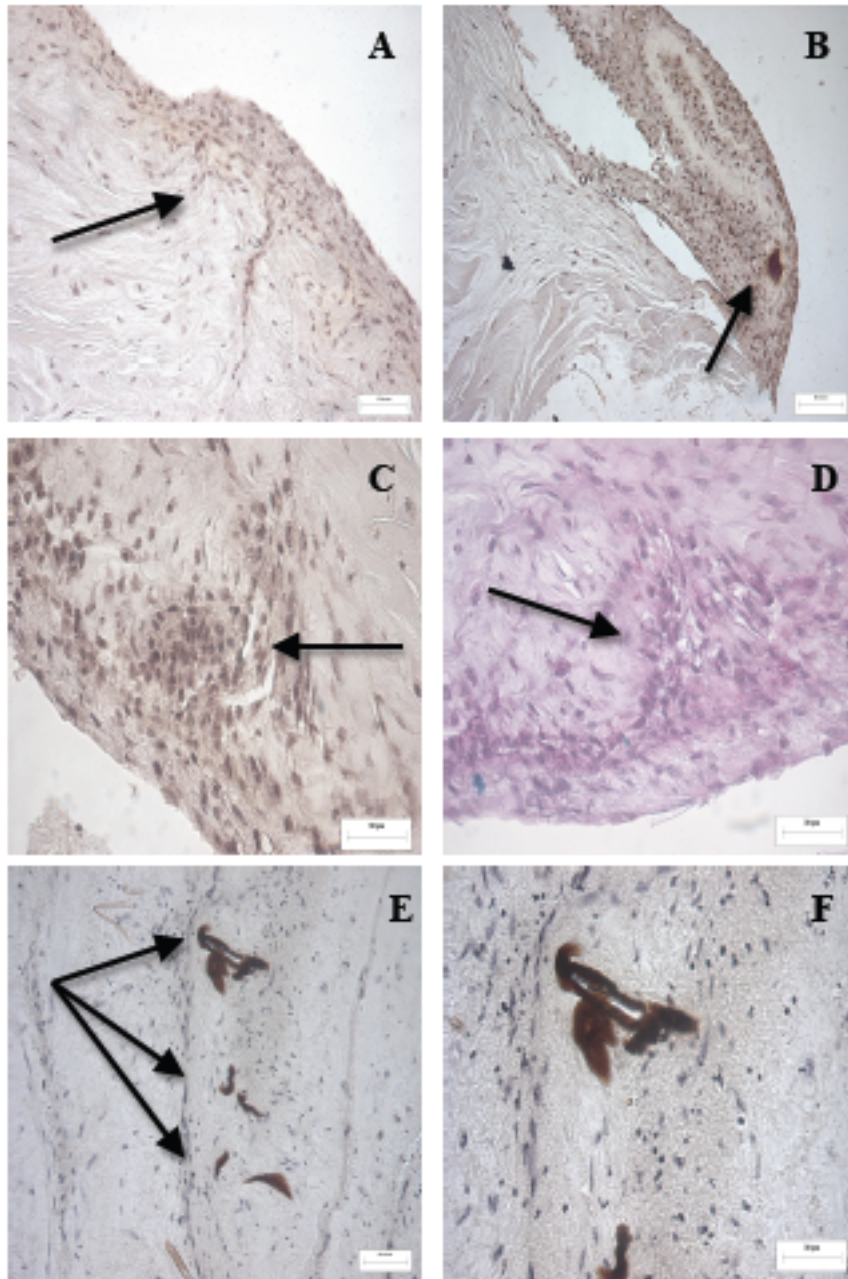


Abbildung 27: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 1 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten

A) 1. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: bereits nach 4 Wochen neu gewachsene Zellen, die in die Tiefe der Sehne eindringen.

ERGEBNISSE

B) 1. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: es ist eine neu an die Sehne gewachsener Anteil zu erkennen, der sehr viele Zellen aufweist. In diesem neuen Abschnitt kann auch ein dunkler kalkähnlicher Herd (Pfeil) ausgemacht werden (vgl Bild A in Abb. 24).

C) 2. Monat, van Kossa, 40x Vergrößerung: ein Zellhaufen (Nodule) (Pfeil) ist im Randbereich der Sehne ist bei 40 facher Vergrößerung dargestellt.

D) 2. Monat, PAS, 40x Vergrößerung: der gleiche Sehnenabschnitt wie in Bild C ist hier in einer PAS Färbung zu sehen. Die dunkel lila gefärbten Areale deuten auf Glykogeneinlagerungen und damit auf Zellaktivität hin.

E) 3. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: mehrere dunkel angefärbte Areale, die eine Verkalkung anzeigen könnten, sind in das Sehnengewebe eingebaut.

F) 3. Monat, van Kossa, 40x Vergrößerung: ein möglicher verkalkter Bereich in 40 facher Vergrößerung. Die dunkelbraun angefärbten Areale sind in die Sehnenstruktur eingebaut.

Sehne + Aussaat ohne BMP-2 Applikation

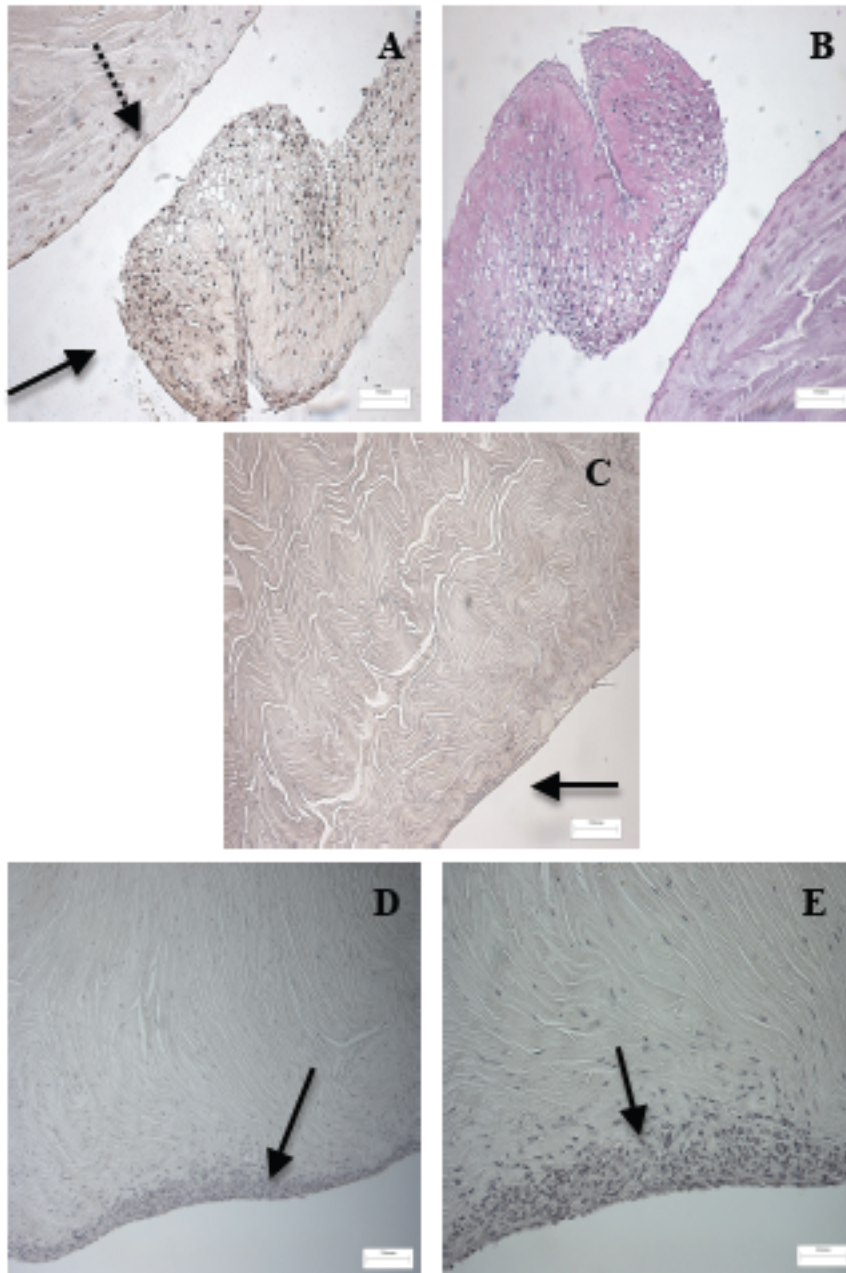


Abbildung 28: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 2 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten

A) 1. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: Dieses Bild zeigt einen Sehnenabschnitt, mit vielen neu gebildeten Zellen (Pfeil). Im Bereich der „Hauptsehne“ (gestrichelter Pfeil) sind am Rand jedoch nur sehr wenige Zellen auszumachen.

ERGEBNISSE

B) 1. Monat, PAS, 20x Vergrößerung: der entsprechende Sehnenabschnitt wie in A ist hier noch einmal in einer PAS Färbung dargestellt, wobei die dunkel lila angefärbten Areale Glykogeneinlagerungen darstellen, die wiederum für Zellaktivität sprechen.

C) 2. Monat, van Kossa, 10x Vergrößerung: In diesem Bild sieht man einen relativ großen Sehnenabschnitt, der wenige Zellen beinhaltet. Auch die Randbereiche der Sehne weisen nur einen sehr dünnen Zellrasen auf, den man bei genauem hinsehen (Pfeil) erkennt.

D) 3. Monat, van Kossa, 10x Vergrößerung: Hier ist ein Zellrasen gezeigt, der nach 3 monatiger Kultivierung an den Sehnenrand gewachsen ist.

E) 3. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: der entsprechende Abschnitt wie in Bild D in 20 facher Vergrößerung.

Sehne ohne Aussaat + BMP-2 Applikation

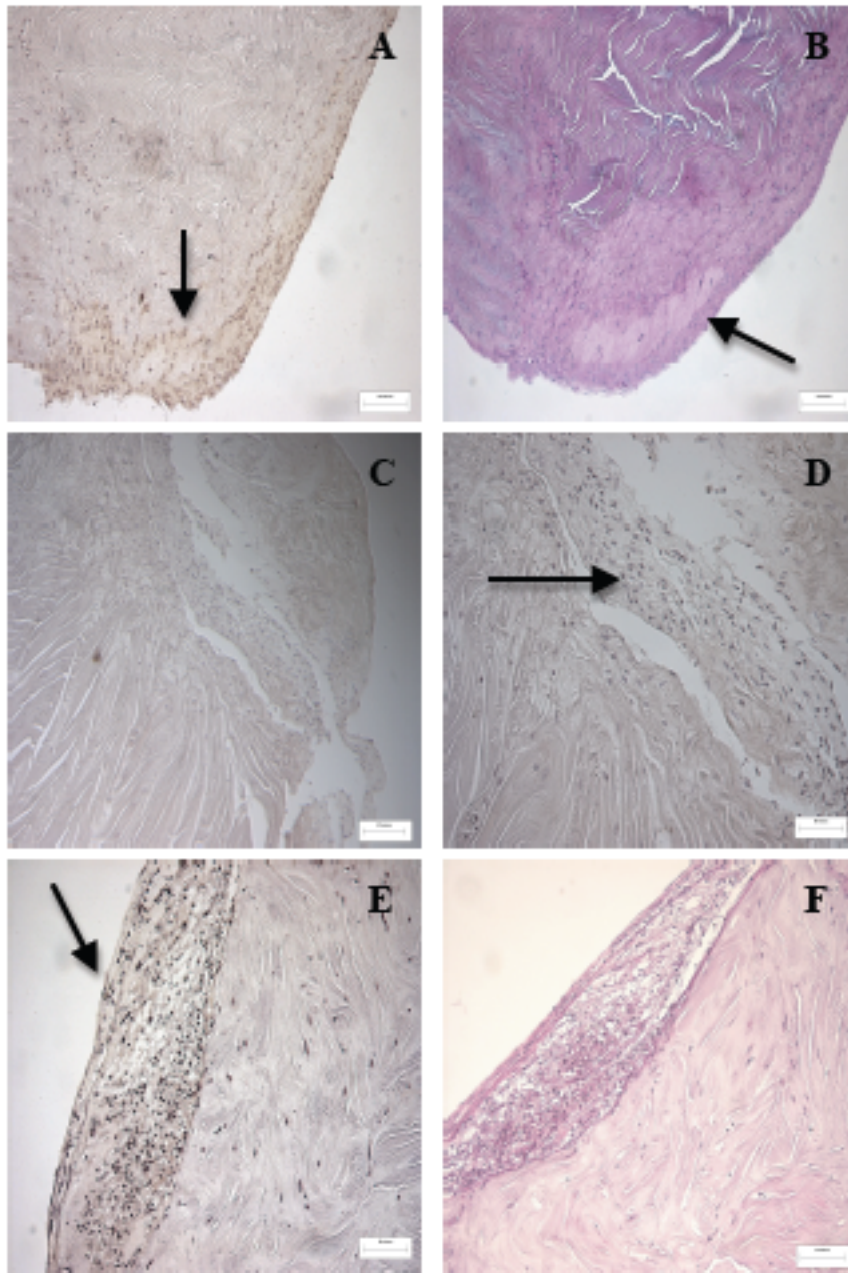


Abbildung 29: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 3 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten

A) 1. Monat, van Kossa, 10x Vergrößerung: ein neu an die Sehne gewachsener Zellrasen ist im unteren Bereich der Sehne (Pfeil) zu erkennen (Vgl. Bild C in Abb. 24)

ERGEBNISSE

B) 1. Monat, PAS, 10x Vergrößerung: der entsprechende Abschnitt von Bild A hier noch einmal in der PAS Färbung. Die blassrosa gefärbten Anteile (Pfeil) zeigen bereits gebildetes Osteoid.

C) 2. Monat, van Kossa, 10x Vergrößerung: Die durch den Einbettvorgang leicht eingerissene Sehne (bereits oben beschrieben) zeigt in der Bildmitte deutlich die neu gewachsenen Zellen

D) 2. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: der entsprechende Abschnitt von Bild C hier in 20 facher Vergrößerung. Die zahlreichen neu gewachsenen Zellen (Pfeil) sind hier noch besser zu erkennen.

E) 3. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: Hier ist ein großer, neu an die Sehne gewachsener, Anteil zu erkennen (Pfeil).

F) 3. Monat, PAS, 20x Vergrößerung: Der entsprechende Abschnitt von Bild E hier noch mal in der PAS Färbung. Der neu an die Sehne gewachsener Anteil hebt sich farblich dunkel lila von der sonst rosa gefärbten Sehne ab.

ERGEBNISSE

Sehne ohne Aussaat ohne BMP-2 Applikation

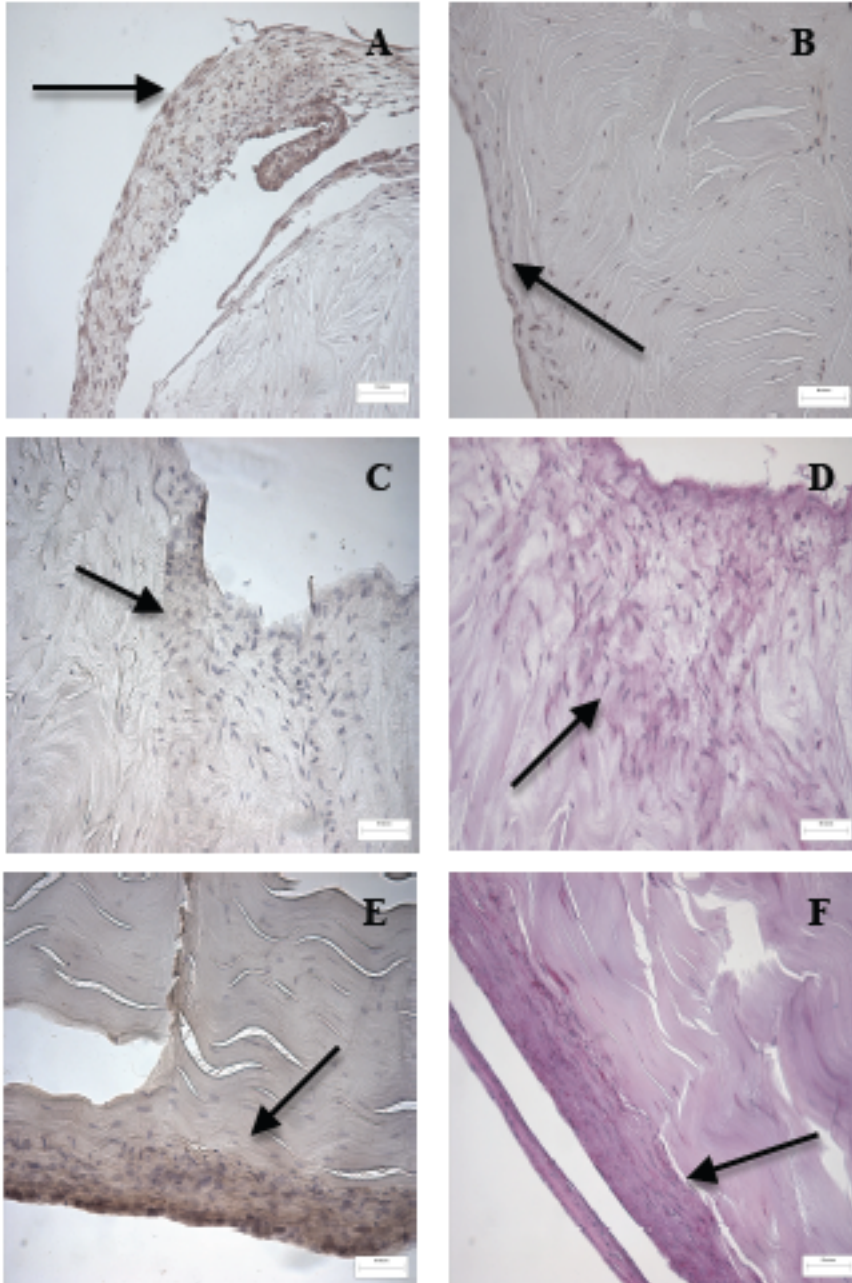


Abbildung 30: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 4 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten

A) 1. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: Man erkennt einen neu an die Sehne gewachsenen Bereich (Pfeil), der in der Bildmitte viele neu gebildete Zellen aufweist.

ERGEBNISSE

B) 2. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: Darstellung des Sehnenrandes nach 2 monatiger Kultivierung. Am Sehnenrand ist nur ein sehr schmaler Saum (Pfeil) von neu gebildeten Zellen zu sehen.

C) 3. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: Das oben beschriebene Bild in 20 facher Vergrößerung. Nur in der Bildmitte sind einige Zellen zu sehen, die in das Zentrum der Sehne vorzudringen scheinen (Pfeil). Die Umgebung ist relativ zellarm.

D) 3. Monat, PAS, 20x Vergrößerung: der gleiche Abschnitt in PAS Färbung. Die Zellen sind dunkel lila dargestellt, was auch nach der 3 monatigen Kultivierungszeit für stoffwechselaktive Zellen spricht.

E) 3. Monat, van Kossa, 20x Vergrößerung: Darstellung des Sehnenrandes mit neu gebildetem Zellrasen. Durch die Einbettvorgänge ist ein Riss in der Sehne zu erkennen

F) 3. Monat, PAS, 20x Vergrößerung: hier wird ein ähnlicher Abschnitt, wie in Bild E in einer PAS Färbung aufgezeigt.

4.2.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM):

REM, 1. Monat

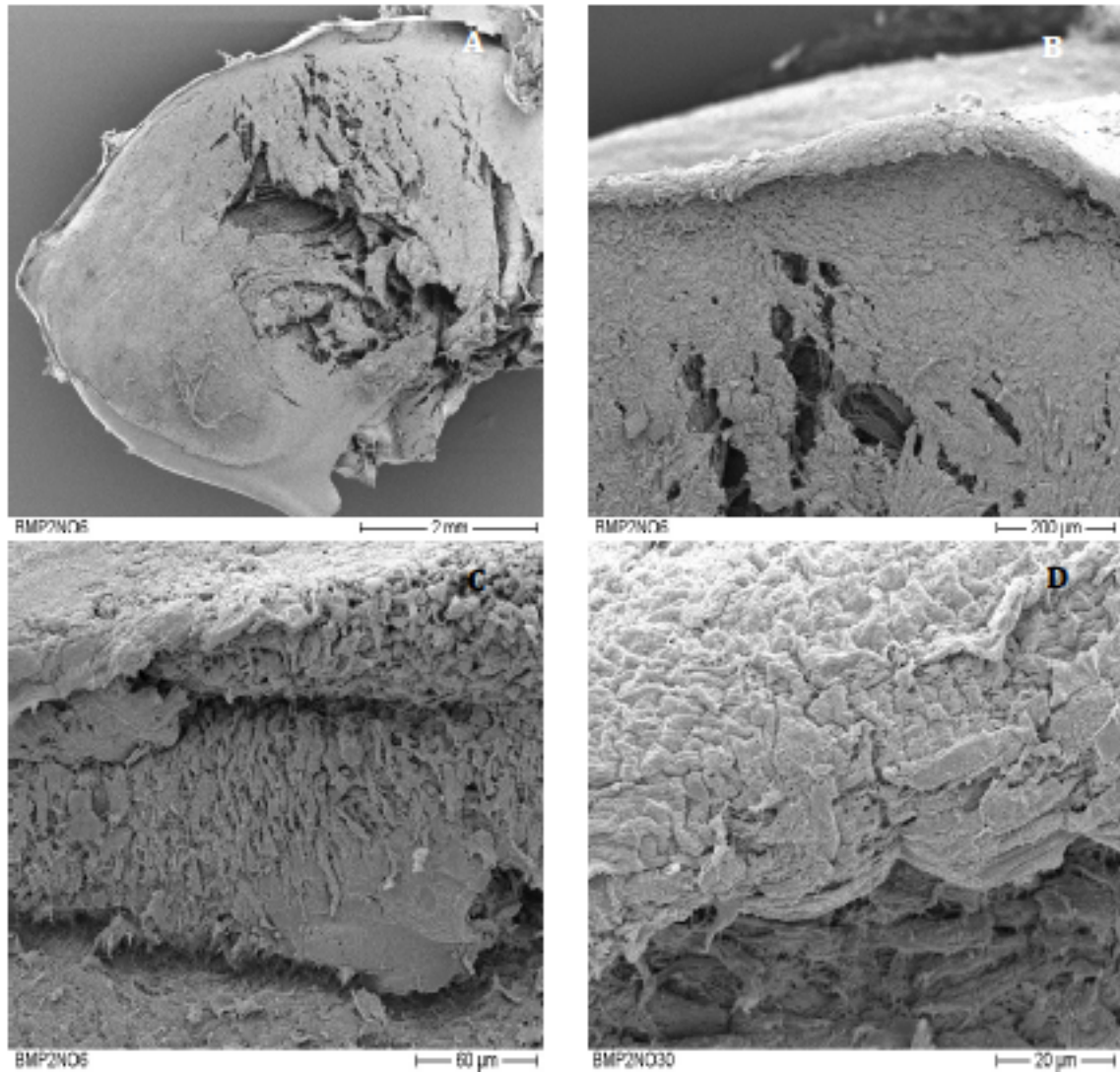


Abbildung 31: REM: Aufnahmen einer Sehne aus Gruppe 1 (POB+BMP-2) nach 4 Wochen in Kultur

A) Übersichtsvergrößerung einer Sehne nach 4 Wochen in Kultur

B) Darstellung des unteren Sehnenrands

C) unterer Sehnenrand in höherer Vergrößerung. Die stark neu gebildete EZM mit vielen kleinen Zellen ist gut zu erkennen

ERGEBNISSE

D) hier ist ebenfalls der untere Sehnenrand zu erkennen. Viele neu gebildete Zellen und EZM überwuchern den Randbereich der Sehne

REM, 2. Monat

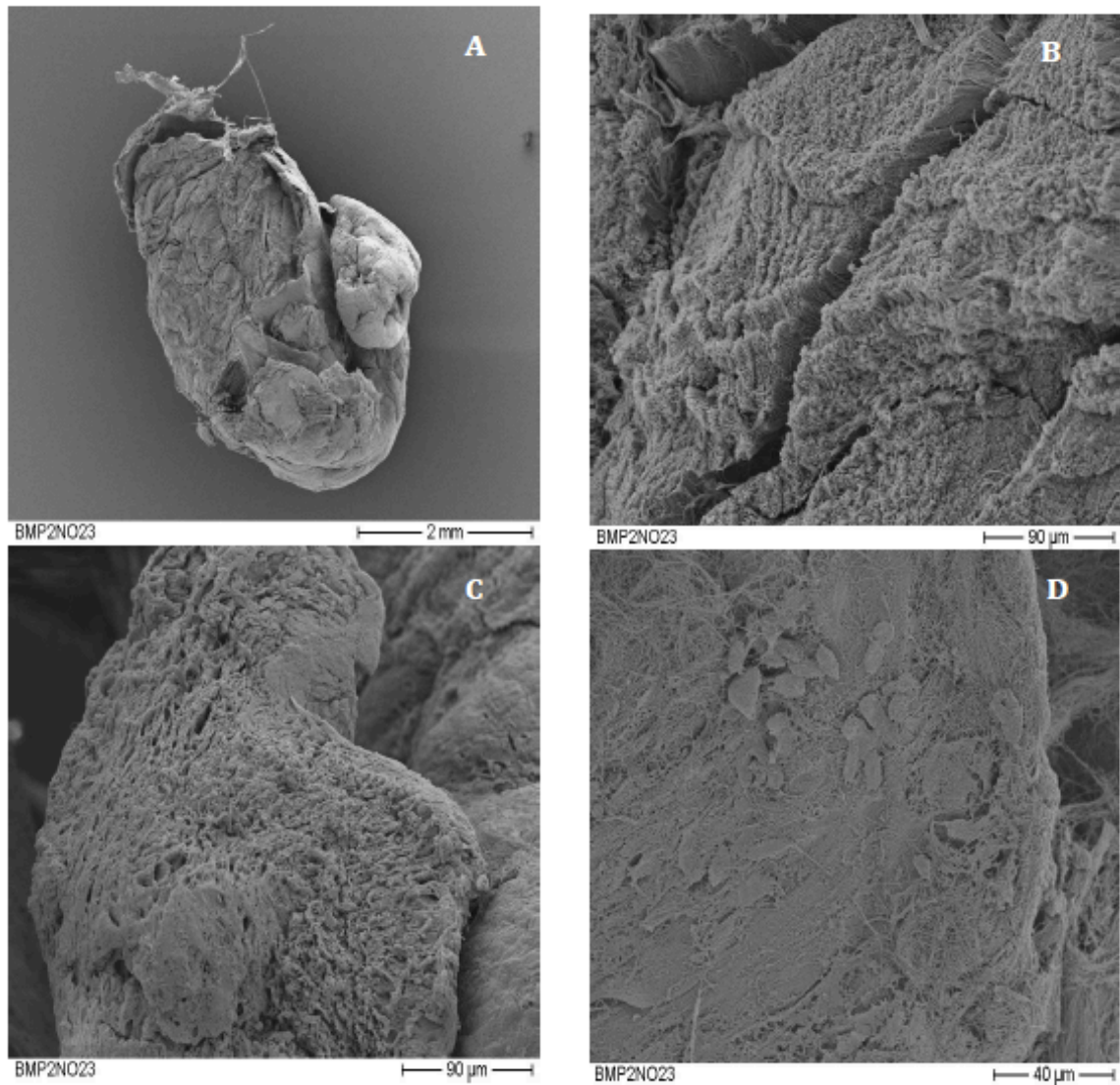


Abbildung 32: REM: Aufnahmen einer Sehne aus Gruppe 1 (POB+BMP-2) nach 8 Wochen in Kultur

A) Übersichtsvergrößerung einer Sehne nach 8 Wochen in Kultur

B) Seitenanschnitt der Sehne. Es sind die einzelnen Faserbündel zu erkennen

C) neu gebildete extrazelluläre Matrix am Rand der Sehne

ERGEBNISSE

D) gerade im oberen Bildabschnitt sind viele Zellen zu erkennen, die EZM Bestandteile bilden

REM, 3. Monat

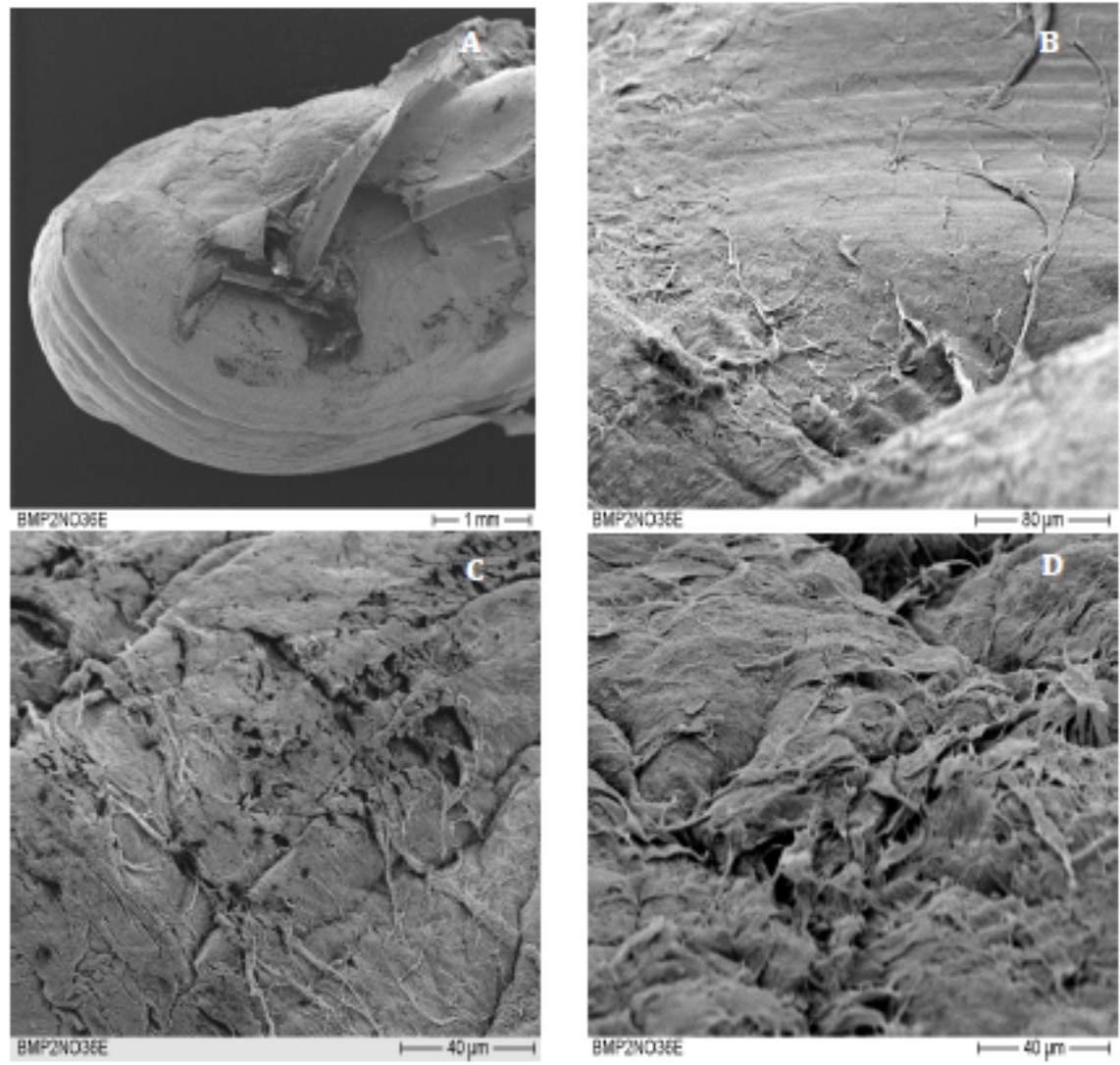


Abbildung 33: REM: Aufnahmen einer Sehne aus Gruppe 1 (POB+BMP-2) nach 12 Wochen in Kultur

A) Übersichtsvergrößerung einer Sehne nach 3 monatiger Kultivierung

B) neu gebildete EZM; Zell Nodule (im Bild: unten links)

C) extrazelluläre Matrix

D) extrazelluläre Matrix

4.3 Analytbestimmung Zusatzversuch

In dem ergänzenden Zusatzversuch wurde die direkte BMP-Wirkung auf die einzelnen Zelltypen in unserer Zellkultur untersucht. Wie bereits unter 3.8.1. beschrieben haben wir hierfür folgende Gruppen gebildet.

- Gruppe 1: Osteoblasten ohne BMP-Applikation
- Gruppe 2: Osteoblasten mit BMP-Applikation
- Gruppe 3: Fibroblasten ohne BMP-Applikation
- Gruppe 4: Fibroblasten mit BMP-Applikation
- Gruppe 5: Osteoblasten – Fibroblasten Mischkultur (80:20) ohne BMP-Applikation
- Gruppe 6: Osteoblasten – Fibroblasten Mischkultur (80:20) mit BMP-Applikation

Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen nur mit dem modifizierten BGJ Medium versorgt. Ab Tag 12 erhielten die entsprechenden Gruppen (2/4/6) alle 24 Stunden eine BMP-Applikation.

4.3.1 Analyte aus Lyse

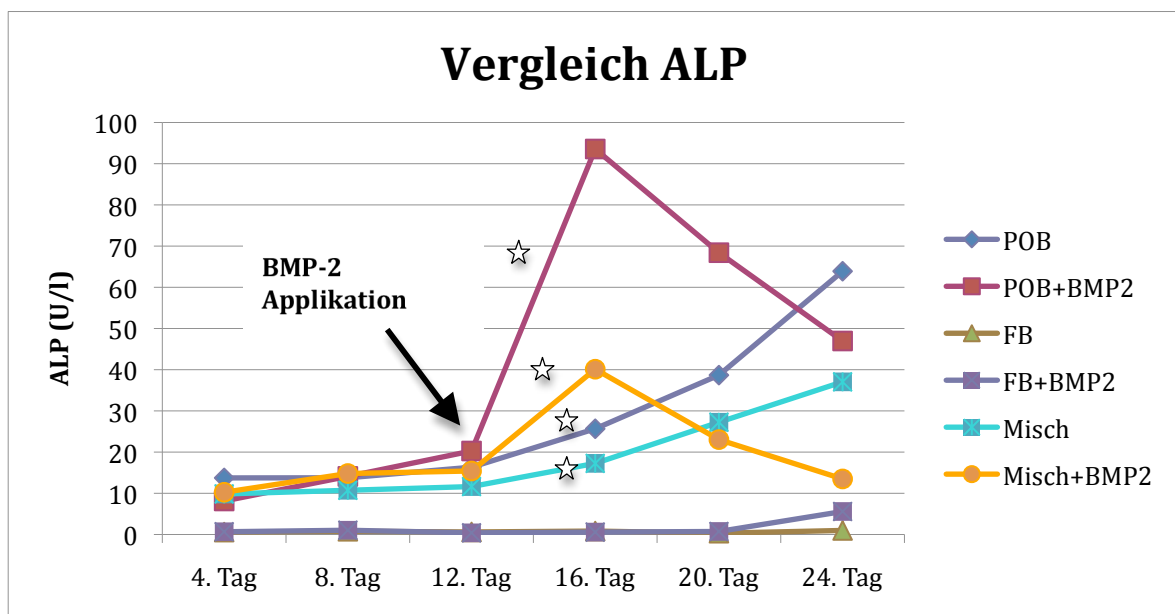


Abbildung 34: Zusatzversuch: ALP Aktivitätsvergleich der Gruppen 1-6 (Analyte aus Lyse), signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)

ERGEBNISSE

Die alkalische Phosphatase wurde aus dem Zelllysat nach dem identischen Verfahren wie im Hauptversuch bestimmt.

In Abbildung 34 sieht man, dass die Fibroblastengruppe (lila/grün) auf niedrigstem Niveau verläuft. Hier lässt sich bis zum Tag 20 nahezu keine ALP nachweisen.

In den restlichen vier Gruppen steigen die ALP-Konzentration ab dem 12. Tag (BMP-Zugabe) sichtbar an. Gruppe 2 und 6 (+BMP) haben einen deutlich steileren Anstieg ($p < 0,004$) als die Gruppen 1 und 5 ($p < 0,004$ bzw. $p < 0,006$), fallen jedoch ab Tag 16 wieder ab, wohingegen die Gruppen ohne BMP-Zusatz kontinuierlich ansteigen.

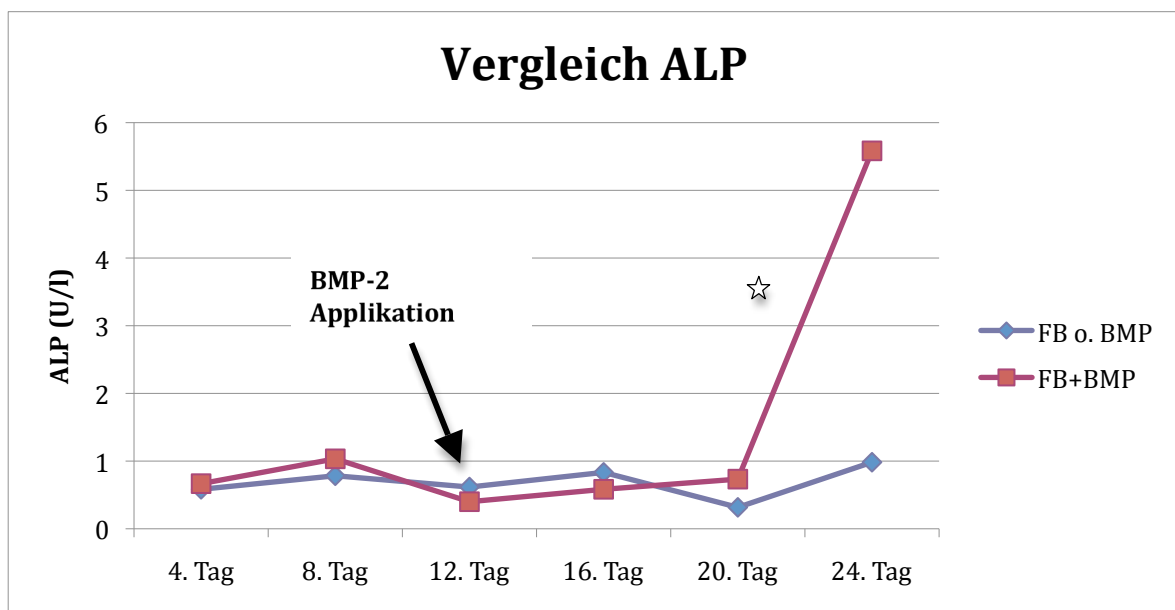


Abbildung 35: Zusatzversuch: ALP Konzentrationsvergleich der Gruppen 3 und 4 (Analyte aus Lyse), signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)

In Abbildung 35 sind noch einmal die Gruppen der Fibroblasten gesondert aufgetragen. Man erkennt einen annähernd gleichen Verlauf in den ersten 20 Tagen. Die ALP-Aktivitäten befinden sich zwischen 0 und 1 U/l. Jedoch ist in den letzten 4 Tagen der Versuchslaufzeit ein signifikanter ($p < 0,004$) Anstieg der ALP-Aktivität in der BMP-Gruppe zu erkennen. Es werden Werte von 5,58 U/l erreicht.

ERGEBNISSE

Die einzelnen Mittelwerte und Standardabweichungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

POB			POB+BMP2		
	MW	STABW		MW	STABW
4. Tag	13,73	1,61	4. Tag	8,13	3,15
8. Tag	13,77	2,43	8. Tag	14,10	2,28
12. Tag	16,33	2,12	12. Tag	20,27	2,53
16. Tag	25,67	1,96	16. Tag	93,57	1,97
20. Tag	38,68	2,74	20. Tag	68,40	3,01
24. Tag	63,90	2,98	24. Tag	46,97	2,02

FB			FB+BMP2		
	MW	STABW		MW	STABW
4. Tag	0,58	0,16	4. Tag	0,67	0,53
8. Tag	0,78	0,33	8. Tag	1,03	0,60
12. Tag	0,62	0,25	12. Tag	0,40	0,19
16. Tag	0,83	0,15	16. Tag	0,58	0,35
20. Tag	0,32	0,26	20. Tag	0,73	0,37
24. Tag	0,98	0,63	24. Tag	5,58	2,52

Misch			Misch+BMP2		
	MW	STABW		MW	STABW
4. Tag	9,83	1,88	4. Tag	10,25	1,59
8. Tag	10,73	2,13	8. Tag	14,80	2,23
12. Tag	11,63	2,33	12. Tag	15,42	1,51
16. Tag	17,27	1,74	16. Tag	40,12	2,44
20. Tag	27,25	1,96	20. Tag	23,03	1,67
24. Tag	37,05	2,65	24. Tag	13,48	1,80

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der ALP-Werte aus Lyse

4.3.2 Analyte aus Medienüberständen

Analog zum Hauptversuch sind, wie bereits beschrieben, auch die Analyte aus den Medienüberständen bestimmt worden. Dabei wurden die Medienüberstände alle 4 Tage gesammelt um später die Analyte ALP, LDH und Laktat bestimmen zu können.

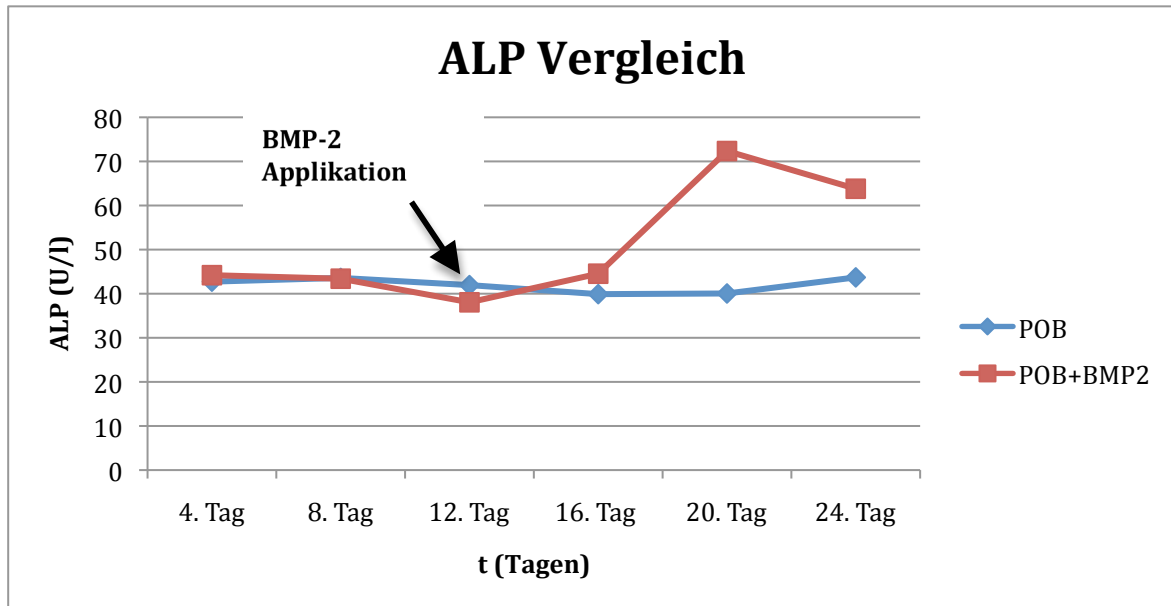


Abbildung 36: Zusatzversuch: ALP Konzentrationsvergleich der Gruppen 1 und 2 (Analyte aus Medienüberstand)

In Abbildung 36 werden die Gruppen 1 und 2 bezüglich ihrer ALP-Konzentrationen miteinander verglichen. In den ersten 14 Tagen ist beinahe kein Unterschied zwischen ihnen auszumachen. Während die Gruppe ohne BMP allerdings über den gesamten Zeitraum annähernd konstante ALP-Werte aufweist, ist ab dem 16. Tag ein deutlicher Anstieg in der BMP Gruppe zu erkennen. Aufgrund der geringen Fallzahlen (Tag 20: n=3, Tag 24: n=2) kann jedoch dieser Anstieg nicht als signifikant angesehen werden. Es werden Maximalwerte von 72,35 U/l erreicht.

ERGEBNISSE

Es folgt die Auflistung der einzelnen Mittelwerte und Standardabweichungen.

POB	ALP	
	MW	STABW
04. Tag	42,73	1,29
08. Tag	43,58	1,78
12. Tag	41,95	1,97
16. Tag	39,90	1,31
20. Tag	40,05	1,06
24. Tag	43,70	0,00

POB+BMP2	ALP	
	MW	STABW
04. Tag	44,20	1,16
08. Tag	43,40	1,76
12. Tag	38,05	1,07
16. Tag	44,53	1,33
20. Tag	72,35	3,04
24. Tag	63,80	0,00

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der ALP-Werte aus Medienüberständen

5 Diskussion

5.1 allgemeine Beobachtungen

Unser in-vitro-Zellkultur-Modell macht es möglich, Sehnen über einen längeren Versuchszeitraum zu kultivieren und ihr Verhalten in Nährlösungen zu analysieren und zu interpretieren. Durch eine geeignete Zusammensetzung des Nährmediums, richtige Wahl der Kultivierungszeit und häufige Medienwechsel konnte eine Gesamtversuchszeit von 10 Wochen erreicht werden, welche als Grundlage für weitere Untersuchungen im Prozess der Knochen-Sehnen-Interaktion eine ideale Voraussetzung ist.

Um das Verhalten der Sehnen auf eine BMP-Applikation in vitro zu untersuchen wurden biochemische, histologische und rasterelektronenmikroskopische Auswertungen der Versuchsergebnisse vorgenommen. Für eine aktivitätssteigernde Wirkung von BMP-2 auf Osteoblasten und Fibroblasten und damit verbunden auf die Induktion der Osteogenese konnten wir mehrere Hinweise in unserem Modell aufzeigen, wenngleich zum definitiven Beweis dieser in vitro Wirkung noch mehrere Studien nötig sind.

Die ALP-Aktivität war in Medienüberstand und Zelllyse über lange Zeiträume bei denjenigen Gruppen mit BMP-Applikation höher, als bei entsprechenden Kontrollen. Solche positiven Effekte des BMPs auf die Aktivität osteoblastärer Zelllinien, messbar durch eine Erhöhung der ALP, wurden bereits in einigen Vorläuferstudien aufgezeigt (17, 74, 78, 81) und konnten durch unsere Untersuchungen weitestgehend bestätigt werden.

Die Wirkung einer BMP-Applikation auf die Bildung von extrazellulärer Matrix und damit verbunden auf die Induktion der Osteogenese, wird unter anderem in den histologischen Bildern sichtbar gemacht. So kann man in den Gruppen 1 und 3 (BMP-Applikation) einen stärkeren Zellzuwachs an die Sehne erkennen, als in den Kontrollgruppen 2 und 4. Kalkähnliche Strukturen und beginnende Ossifikationsherde sind ebenfalls nur in den, durch BMP stimulierten, Sehnen zu erkennen. Unsere Beobachtungen und Vermutungen konnten durch die Untersuchungen von Li et al. (37), der die Wirkung von BMP auf die Produktion der extrazellulären Matrix untersucht hat, bekräftigt werden.

Die aufgezeigten rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse geben nur einen Blick auf die Verhältnisse einer bestimmten Gruppe (Gruppe 1: Sehne+POBs+BMP-2

DISKUSSION

Applikation). Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen sind schwer aufzuführen, da man lediglich kleinste Ausschnitte der Sehne mikroskopisch beurteilen kann. Es ist allerdings ein Zellrasen zu erkennen, der sich um die Sehne herum bildet und eine Voraussetzung für spätere Verknöcherungsprozesse darstellt.

In einem Zusatzversuch wurde die Wirkung des BMP-2 auf verschiedene Zelltypen getestet. Hierbei wurden neben reinen Kulturen von Osteoblasten und Fibroblasten, auch Mischkulturen (POB+FB) angelegt. Positive Effekte von BMP auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden besonders in der Osteoblastengruppe und der Mischkultur sichtbar. Die Fibroblasten zeigten ebenfalls einen Anstieg der ALP, wenngleich auch etwas verzögert.

Hieraus lassen sich zum einen Vermutungen über eine direkte Wirkung des BMPs auf Fibroblasten anstellen, zum anderen zeigen unsere Beobachtungen einen möglichen hemmenden Effekt der Fibroblasten auf die Osteoblasten in Co-Kultur. Ähnliche Phänomene beschreiben Ning E. Wang et al. (73) in ihren Studien über Fibroblasten-Osteoblasten Co-Kultivierung.

5.2 Zellkulturergebnisse im Vergleich

5.2.1 Interpretation der Ergebnisse aus Analytbestimmungen

5.2.1.1 ALP aus Medienüberstand:

In Abbildung 16 wird der Effekt einer BMP-2 Applikation auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Medium aufgezeigt. Das untersuchte Nährmedium stammt aus Zellkulturschalen, die sowohl eine Sehne (Fibroblasten/Tendinozyten), als auch Osteoblasten enthielten. Hier sind also ähnliche Verhältnisse, wie bei in vivo Versuchen zur Beurteilung der Knochen-Sehnen-Integration gegeben (29, 41, 82). Wie bereits zuvor beschrieben, erfüllt die alkalische Phosphatase wesentliche Aufgaben im Mineralisationsprozess und wird getriggert durch Ca^{2+} Ionen von Osteoblasten, teilweise an die extrazelluläre Matrix abgegeben (55). Dieser Effekt macht sie auch im Medienüberstand für unsere Versuche messbar.

Abb. 16 zeigt die ALP-Aktivitäten von Gruppe 1 und Gruppe 2 im direkten Vergleich. Während sich in der Kontrollgruppe (ohne BMP/Gr.2) keine wesentlichen Änderungen der ALP-Konzentrationen über die Versuchslaufzeit hinweg darstellen, ist in Gruppe 1 bereits nach 2 Wochen eine Aktivitätssteigerung der ALP zu erkennen. Dieser Peak

DISKUSSION

könnte durch die Applikation des Knochen-Wachstumsfaktors erklärt werden. Die beiden Abfälle der ALP-Aktivität in Woche 2-3 sowie 6-7 könnten wie folgt interpretiert werden:

Die Osteoblasten sezernieren, um eine überstarke Ossifikation zu verhindern, verschiedene BMP-Inhibitoren, wie zum Beispiel Noggin und Chordin (1, 7). Diese Antagonisten verdrängen das BMP von seinem Rezeptor und blockieren somit die Ereignisse, die zur Transkription von Zielgenen und in einem nächsten Schritt zur Differenzierung der Osteoblasten führen. Folglich wird weniger ALP gebildet und es kommt nach einem initialen Anstieg der ALP-Aktivität zu einem Abfall.(40) Eine Möglichkeit diesem Hemmprozess zu entgehen, ist die Verwendung von BMP Heterodimeren. So zeigten Zhu et al., dass BMP 2/7 Heterodimere einerseits potentere Induktoren der Osteoblasten sind und andererseits bei gleicher Dosis die Expression von Noggin signifikant weniger induzieren als Homodimere.(87)

Abbildung 17 zeigt den Vergleich der Gruppen 3 und 4. Es handelt sich hierbei um die Kulturmedien, die zu Beginn des Versuches nicht mit primären bovinen Osteoblasten (POBs) versetzt wurden. Diese Versuchsgruppen dienten dazu, Wirkungen von BMP-2 auf Fibroblasten/Tendinozyten zu untersuchen. Ein Effekt des BMPs ist auch hier zu erkennen. In den Kulturen, die mit BMP behandelt wurden, lassen sich höhere ALP-Aktivitäten messen, als in den Kontrollgruppen. Der Abfall des Graphen der Gruppe 3 (blau), erstreckt sich hier über einen längeren Zeitraum (von Woche 4 bis Woche 7). Interessant für unsere Untersuchungen ist die Tatsache, dass auch ohne eine vorherige Applikation von Osteoblasten eine ALP-Erhöhung durch BMP-Zugabe erzielt werden kann. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung ist die Eigenschaft des BMP, Fibroblasten in Osteoblasten umzuwandeln. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor bereits von Luo et al.(38) gemacht und könnten diese ALP-Erhöhung durchaus erklären. Denkbar wäre allerdings auch, dass BMP-2 eine direkte Wirkung auf die Fibroblasten hat und diese zur verstärkten Sekretion von ALP anregt. Dieses Phänomen würde folglich für eine von Fibroblasten ausgehende Ossifikation sprechen und wird später noch ausführlich diskutiert.

Der Abfall der ALP-Aktivitäten könnte analog zur vorherigen Abbildung durch den verstärkten Einfluss der BMP Antagonisten erklärt werden. (7)

5.2.1.2 OCN aus Medienüberstand

Osteocalcin gilt als wohl sensitivster Osteoblasten Marker (35) und wurde von uns mittels eines Elisas auf einer 96 Well Plate bestimmt. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen keinerlei Bezug zu den restlichen Resultaten. Unterscheidungen zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht sicher zu treffen. Da OCN als ein sehr instabiler Analyt gilt und alle Werte am Ende des Versuchszeitraums zusammen bestimmt wurden, lassen sich zahlreiche Ursachen für die unspezifischen Ergebnisse aufführen. Es könnten zum einen Probleme im Handling mit dem Elisa Kit (ungenau Pipettierschritte, unvollständiges Auswaschen der 96 Well Plates während des Bestimmungsvorgangs etc.) für diese Resultate verantwortlich sein, zum anderen könnten das OCN bereits durch den Einfriervorgang zur Lagerung bzw. durch das anschließende Auftauen für die Bestimmung der Konzentrationen teilweise zerfallen sein.

Bei Folgeuntersuchungen sollte das OCN direkt nach der Entnahme des Mediums (also wöchentlich) bestimmt werden, um die Einfrier- und Auftauvorgänge zu vermeiden. Zusätzlich wäre es sinnvoll, eine Doppel- Dreifachbestimmung durchzuführen, um eventuelle Fehler besser detektieren zu können.

5.2.1.3 LDH aus Medienüberstand

Zur Interpretation der LDH-Konzentrationen muss zunächst gesagt werden, dass die LDH in Zellkultur gemeinhin als Zelluntergangsmarker genutzt wird. (8, 36, 59)

In unseren Kulturen handelte es sich in über 90% um das Isoenzym LDH₅, dies wurde vom Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg analysiert.

In der vorliegenden Grafik (Abb. 20) sind die LDH-Konzentrationen aller Gruppen (1-4) über die gesamte Versuchslaufzeit gegeneinander aufgetragen. Zunächst ist festzustellen, dass nur geringe Unterschiede der einzelnen Versuchsgruppen auszumachen sind. Auffallend ist das deutliche Absinken der LDH-Konzentrationen zwischen Woche 3 und Woche 5. In dieser Zeit scheint nur geringer Zelluntergang stattzufinden. Der folgende Anstieg deutet hingegen auf einen erhöhten cell-turnover hin, der besonders in Gruppe 1 mit BMP und POB Aussaat deutlich wird. Insgesamt lassen sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ausmachen ($p > 0,05$).

5.2.1.4 Laktat aus Medienüberstand

In allen Gruppen wurden ähnliche Laktat-Konzentrationen gemessen (Abb. 21). Die Graphen zeigen beinahe parallele Verläufe und keine allzu großen Schwankungen. Der Spitzenwert von 16,16 mmol/l wird in Woche 2 erreicht. Durch Zellvitalitätstests (MTT-Tests) haben wir in unseren Vorversuchen (Resultate hier nicht aufgeführt) bereits nachgewiesen, dass vermehrter Zelluntergang erst ab Laktat-Konzentrationen von 20 mmol/l zu erwarten ist. Während der gesamten Versuchslaufzeit wurde das Zellwachstum lichtmikroskopisch überwacht. Auch hier konnten keine Anzeichen von vermehrtem Zelluntergang festgestellt werden. Das Medium war über die Gesamtlaufzeit des Experiments klar und zeigte keine Verfärbungen. Durch stichpunktartige Kontrollen des pH-Wertes, wurden die Kulturbedingungen zusätzlich überprüft.

Wie bereits unter anderem von Mikami et al. beschrieben (43), ist ein Medienwechsel alle 48 Stunden sinnvoll und sollte für Folgeversuche ebenso beibehalten werden.

5.2.1.5 ALP aus Zelllyse

Eine bessere Aussagekraft für die Aktivität der Osteoblasten/Fibroblasten in Zellkultur lässt sich durch die Bestimmung der ALP-Aktivität von lysierten Zellen treffen. Wie zuvor bereits beschrieben, handelt es sich bei der ALP um ein Enzym, das in Zellmembranen gebunden vorliegt. Im Zuge des Mineralisierungsprozesses wird sie zwar an die Zellumgebung abgegeben (49) und ist daher für uns im Medienüberstand messbar, die gesamte Aktivität der ALP lässt sich jedoch nur durch das Auflösen der Zellmembran in Form einer Zelllyse bestimmen.

Die Balkendiagramme in Abb. 22 und 23 (S. 60/61) zeigen die Ergebnisse der Zelllyse unseres Hauptversuchs. Es wurden zum einen die Gruppen 1 und 2, zum anderen die Gruppen 3 und 4 miteinander verglichen. Zu allen drei Messzeitpunkten liegen in beiden Darstellungen die BMP-2 stimulierten Gruppen über den Kontrollen. Deutlicher sind die Unterschiede in Abb. 22 zu erkennen, was wohl auf die Anwesenheit der Osteoblasten im Vergleich zu Gruppen 3 und 4 zurückzuführen ist. Analog zu den

DISKUSSION

Messungen aus den Medienüberständen lässt sich in Abb. 22 die höchste ALP-Aktivität im ersten Monat nachweisen. Hier werden Spitzenwerte von über 12 mmol/l in der BMP Gruppe erreicht. Die Abnahme in den folgenden Monaten könnte wiederum durch die beginnende Wirkung der Antagonisten erklärt werden. Die Osteoblasten reagieren auf solch hohe Mengen an BMP mit Ausschüttung von Antagonisten wie z.B.: Noggin oder Chordin (20). Canalis et al. beschreiben die Wirkung der extrazellulären BMP Antagonisten. Demzufolge könnte auch Chordin mitverantwortlich für die Abnahme der ALP über den Zeitraum von 3 Monaten sein. Im Gegensatz zu Noggin wird Chordin zwar nicht direkt „BMP-induziert“ gebildet, es kann jedoch von den Osteoblasten BMP unabhängig exprimiert werden, um vor zu starken Mineralisierungsprozessen zu schützen (7). Van Bezooijen et al. beschäftigten sich mit der Wirkung von Sclerostin. Sclerostin wird als Teilantagonist von Bone Morphogenetic Proteins angesehen. Es besitzt im Gegensatz zu Noggin und Chordin keine Affinität zu bestimmten BMPs (Noggin: BMP-2, 4 und 7), sondern kann antagonisierend auf alle BMP-Gruppen Einfluss nehmen. Zudem unterscheidet es sich von dem Zeitpunkt, an dem es seine Wirkung entfaltet. Während die klassischen extrazellulären Antagonisten bereits in den frühen Mineralisierungsprozess negativ eingreifen, wird Sclerostin erst in späteren Abschnitten dieses Prozesses von den Osteoblasten ausgeschüttet. (71)

Somit könnte das kontinuierliche Abnehmen der ALP-Aktivität in Abbildung 22 (S. 60) teilweise durch die Osteoblasten induzierte Antagonisierung des Mineralisationsprozesses erklärt werden.

Weiterhin ist die Abnahme der ALP-Aktivität natürlich auch ein Stück weit physiologisch. Je mehr Osteoblasten zwischen die mineralisierte Matrix als Osteozyten eingebaut werden, desto weniger ALP kann folglich sowohl im Medienüberstand, als auch in der Lyse nachgewiesen werden. Da im 3. Monat die geringsten Werte gemessen werden, könnte man annehmen, dass in Gruppe 1 bereits Osteoidbildung bzw. Kalzifizierung stattgefunden hat. Diese Mutmaßung konnte auch durch unsere histologischen Ergebnisse bekräftigt werden.

Im Vergleich der Gruppen 3 und 4 (Abb. 23, S.61) werden die höchsten ALP-Werte im zweiten Monat gemessen. Dieser erst später eintretende Effekt des BMPs könnte für Umwandlungsprozesse der Fibroblasten in Osteoblasten sprechen (s.o.)(56). Das Hauptaugenmerk dieser Grafik liegt auf dem Effekt des BMPs auf die Fibroblasten. Man kann erkennen, dass die ALP-Werte in der BMP-Gruppe zu allen 3 Messzeitpunkten über den Werten der Kontrollgruppe liegen. Wie bereits in Abb. 17

DISKUSSION

aufgezeigt, ist also auch in der Lyse der Einfluss von BMP auf Fibroblasten sichtbar. Wir vermuten folglich eine direkte Wirkung von BMP auf die Aktivität von Fibroblasten.

5.2.2 Interpretation der Ergebnisse aus Histologie

Um die Veränderungen der Sehnen über die Dauer der Kultivierungszeit sichtbar zu machen, wurden histologische Färbungen durchgeführt. Mittels v. Kossa und PAS Färbung sollte zum einen die Zellvitalität überprüft und zum anderen ein beginnender Ossifikationsprozess dargestellt werden. Das Augenmerk liegt hierbei auf den neu entstanden Zellstraßen entlang der Sehne, der Bildung von extrazellulärer Matrix und Osteoid, sowie auf neu gebildeten Kalkherden.

Als problematisch stellt sich sowohl die Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander, als auch die Vergleichbarkeit innerhalb einer Gruppe zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten (1 Monat, 2 Monate, 3 Monate) dar. Die Ursache hierfür sind technische Probleme. Es lässt sich nämlich weder ein und dieselbe Sehne zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysieren, noch ein und dieselbe Sehne in unterschiedlicher Art und Weise behandeln (mit BMP – ohne BMP – mit POB – ohne POB). Möglichkeiten der Standardisierung werden später unter dem Punkt 5.4. diskutiert.

In den Abbildungen 24 – 26 (S. 62-65) wird der Versuch unternommen, die einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen. Während sich nach einem Monat Kultivierung in Gruppe 1 bereits kalkähnliche Formationen (Bild A, Abb. 24) erkennen lassen, sind in den übrigen Gruppen (Bild B, C, D) lediglich Zellansammlungen und Herde von neu gebildeter EZM zu erkennen. Auffallend ist, dass sich Gruppe 2-4 anfangs nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

Die Ergebnisse aus Gruppe 1 passen auch zu den Bestimmungen der ALP aus dem Medienüberstand und der Lyse (vgl. Abb. 18 und 22). So wurden in Lyse und Medienüberständen die höchsten ALP-Werte innerhalb des ersten Monats gemessen. Hohe ALP-Werte sprechen für hohe Osteoblastenaktivität, welche ihrerseits wiederum für hohe Mineralisationsfähigkeit spricht. Es könnte somit innerhalb des ersten Monats die Voraussetzung für die später stattfindende Kalzifizierung getroffen worden sein. Diese frühe Wirkung von BMP-2 beschreiben Yu et. al in ihren Untersuchungen (84). Wenn man die Abbildungen 24 bis 26 betrachtet, so ist dieser Effekt ebenfalls denkbar.

DISKUSSION

Die herausragende Gruppe ist und bleibt über die gesamte Versuchszeit, die Gruppe 1. Im ersten Monat ist eine kleine kalkähnliche Struktur zu erkennen (Abb. 24), im zweiten Monat starke neu gebildete EZM und Zellnodule (Abb. 25) und im dritten Monat mehrere große Kalkherde (Abb. 26). Der triggernde Effekt von BMP-2 auf die Produktion von extrazellulärer Matrix wurde unter anderem bereits von Li et al. beschrieben (37).

Die Fibroblastengruppe (Abb. 24-26, Bild C) mit BMP-Applikation imponiert vor allem durch enormes Zellwachstum im Randbereich der Sehne. Diese Zellansammlungen wirken rein optisch betrachtet stärker, als die der anderen Gruppen, was wiederum analog zur ALP-Bestimmung gesetzt werden kann (Abb.18), wo die zweithöchsten ALP-Werte eben von dieser Gruppe 3 erzielt werden.

Besonders deutlich scheinen diese Unterschiede im dritten Monat zu sein (Abb. 26 Bilder: B, C, D). Hier ist der neu an die Sehne gewachsen Teil in Gruppe 3 am deutlichsten von den anderen Gruppen zu unterscheiden.

Die beiden Gruppen ohne BMP-Applikation (Abb. 24-26, Bilder B/D) haben nach dem ersten Monat scheinbar keine weitere Entwicklung bezüglich des Ossifikationsprozesses. Während sie im erstem Monat noch durch vergleichsweise starkes Zellwachstum imponieren, lassen sich in Monat 2 und 3 nur noch dünne Zellstraßen ausmachen, die von außen an die Sehne heranwachsen bzw. in die Sehne hineinwachsen (Abb. 26, Bild D).

Die einzelnen Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind in den Abbildungen 27 bis 30 (S.67-73) dargestellt. Wie zuvor bereits beschrieben kann man in Abbildung 27 die Entwicklung der Sehnen sehen, die in Co-Kultur mit Osteoblasten kultiviert wurden und zusätzlich alle 48 Stunden eine BMP-2 Applikation erhielten. Es sind zum einen Zellhaufen (=Nodules) (Bilder C u. D) und zum anderen kalkähnliche Strukturen (Bilder B, E, F) zu erkennen. Zellnodule gelten im Gegensatz zur ALP eher als späte Marker der Osteoblastenaktivität. Sie stellen bereits eine Frühform der Mineralisierung dar (71). Auch in anderen Bildern dieser Gruppe (hier nicht aufgeführt), wurden mehrere dieser Nodules gefunden. Dies spricht generell für eine hohe Aktivität der Zellen dieser Gruppe und für beginnende Kalzifizierung auf mehreren Ebenen in den Sehnen. Verglichen mit Abbildung 28, in der zwar Zellwachstum am Sehnenrand zu erkennen ist, scheinen die Sehnen aus Gruppe 1 deutlich weiter im Kalzifizierungsprozess zu sein, was durch den aktivitätssteigernden Einfluss des BMPs auf die Osteoblasten erklärt werden könnte.

DISKUSSION

Auch Gruppe 3 (Abb. 29) imponiert durch stark vermehrte Zellansammlungen (Bilder D/E/F), die von außen an die Sehne herangewachsen sind. Blassrosa eingefärbt kann man in Bild B sogar schon neu entstandenes Osteoid erkennen. Im Vergleich zu den Bildern der direkten Kontrollgruppe (Abb. 30) scheint der Kalzifizierungsprozess hier schon ein wenig weiter fortgeschritten zu sein. Gruppe 4 lässt lediglich Zellproliferationen erkennen, die ganz am Anfang der Kalzifizierungskaskade stehen. Unsere Vermutung, dass BMP auch einen positiven Effekt auf die Aktivität der Fibroblasten hat, kann durch diese Beobachtungen weiter gestützt werden. Es sind allerdings noch genauere Untersuchungen auf molekularer Ebene vonnöten, um diese These zu bestätigen.

Auch wenn sich die Ergebnisse der Histologie durch die oben beschriebene Problematik nicht gut miteinander vergleichen lassen, so können doch zwei Beobachtungen getroffen werden:

Erstens ist Gruppe 1 diejenige Gruppe unter allen, die den am weitesten fortgeschrittenen Kalzifizierungsprozess zeigt. Diese Beobachtungen decken sich mit den ALP-Aktivitäten der Medienüberstände und der Lyse. Daraus lässt sich folgern, dass BMP-2 auch in unserem Modell vermutlich einen triggernden Einfluss auf die Aktivität der Osteoblasten hat. Dieser Einfluss wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben. (17, 51)

Zweitens kann ein positiver Effekt von BMP-2 auf die Fibroblastengruppe (Gruppe 3) vermutet werden. Auch hier scheint die Zellaktivität durch BMP-Applikation gesteigert worden zu sein. Diese Beobachtung wird vor allem im direkten Vergleich der Fibroblastengruppe mit den Kontrollen deutlich.

Es ist also anzunehmen, dass durch BMP in unserem Modell ein aktivitätsfördernder Einfluss sowohl auf Osteoblasten, als auch auf Fibroblasten entsteht, was im Hinblick auf weitere Untersuchungen im Prozess der Knochen-Sehnen Interaktion von Bedeutung ist.

5.2.3 Interpretation der Ergebnisse aus REM

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte ein sehr genauer Blick auf die einzelnen Sehnen geworfen werden. Da keine Schnittbilder erstellt werden konnten (vgl. Histologie), liegt der Fokus der Betrachtungen auf den Ausschnitten am Sehnenrand. Hier sind vor allem die Zellansammlungen und die EZM-Bildung von

DISKUSSION

Bedeutung. Ähnlich wie bei den histologischen Ergebnissen, ist die Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander als schwierig anzusehen. Die REM-Bilder dienen in unserem Versuch lediglich dem besseren Verständnis des beginnenden Kalzifizierungsprozesses.

In Abbildung 31 bis 33 sind je vier Bilder der Gruppe 1 dargestellt. Die Bilder B – D (Abb. 31) zeigen den unteren Sehnenrand. Gerade in den höheren Vergrößerungen (C und D) lässt sich die stark gewachsene EZM erkennen, die den Sehnenrand überwuchert und in die Sehne einzudringen scheint. Vor allem in Bild B sieht man viele Osteoblast-like Cells, die zur Produktion dieser EZM beitragen.

Auch nach zweimonatiger Kultivierung können Zellwachstum und EZM-Bildung nachgewiesen werden (Abb. 32). Hier ist sogar ein Zellnodule (vgl. Histologie) zu erkennen (Bild B).

Die dichte EZM und die dreidimensionale Anlagerung der Osteoblast-like Cells untereinander (Abb. 33, Bild D) mit ihren weiten Ausläufern geben Hinweise auf Kalzifizierungsvorgänge nach dreimonatiger Kultivierung. Mittels der langen Ausläufer (Bild D) kommunizieren die Zellen untereinander und können wichtige Signalstoffe für ihre eigenen Differenzierungsvorgänge austauschen.

Die typischen Prozesse im Rahmen einer Kalzifizierung lassen sich also auch elektronenmikroskopisch am Rand der Sehne nachweisen. Zellansammlungen, EZM und Zellnodule werden in der Literatur häufig als Indizien für beginnende Umbauvorgänge in der Sehne beschrieben. (37, 71, 83)

Die quantitative Auswertung der REM Abbildungen lässt sich jedoch mit unseren Methoden nicht durchführen. Die Aussagekraft der elektronenmikroskopischen Aufnahmen für unsere in vitro Studie ist folglich eher als gering einzustufen und stellt daher lediglich eine Ergänzung zu den biochemischen und histologischen Ergebnissen dar.

5.3 Interpretation der Ergebnisse des Zusatzversuchs

Um die BMP-2 Wirkung auf einzelne Zelllinien unseres Hauptversuchs genauer zu untersuchen, wurde, wie bereits zuvor beschrieben, ein Zusatzversuch durchgeführt. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf dem Zusammenspiel von Fibroblasten und Osteoblasten hinsichtlich der BMP-Wirkung.

DISKUSSION

Ein Effekt der BMP-Applikation auf die ALP-Aktivität lässt sich in Abbildung 34 erkennen.

Die ALP-Aktivität steigt in Gruppe 2 (POB+BMP) am deutlichsten an. Es wird ein Spitzenwert von 93,57 U/l an Tag 16 erreicht, was innerhalb von 4 Tagen mehr als einer Vervierfachung der Aktivität entspricht. In der direkten Vergleichsgruppe (Gruppe 1) lässt sich zwar auch ein leichter Anstieg der ALP-Aktivität erkennen, jedoch ist dieser nicht annähernd so stark wie in der BMP-Gruppe. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass BMP-2 einen triggernden Einfluss auf die Osteoblastenaktivität hat und dadurch den Ossifikationsprozess fördert. Das Absinken der ALP-Aktivität in Gruppe 2 ab Tag 16, lässt sich analog zu den Ergebnissen des Hauptversuchs durch beginnende Selbstantagonisierung (Noggin, Sclerostin, Chordin) (20) und durch die Abnahme der Osteoblastenzahl (Umwandlung in Osteozyten beim Ossifikationsprozess) erklären.

Auch in Gruppe 6 (Mischkultur) ist eine schlagartige Zunahme der Enzymaktivität um mehr als das Doppelte zu erkennen. Dieser Effekt untermauert unsere Vermutung aus dem Hauptversuch, dass BMP einen aktivitätssteigernden Einfluss auf Osteoblasten und zugleich auch auf Fibroblasten hat.

Zwei unterschiedliche Erklärungsmuster wären denkbar um diese Vermutung zu stützen:

Zum einen könnte der etwas geringer Anstieg im Vergleich zu Gruppe 2 durch die geringere Anzahl der Osteoblasten in Zellkultur erklärt werden.

Diese Beobachtung scheint zunächst einleuchtend, da ab dem Tag der BMP-Applikation in Gruppe 4 (Fibroblasten mit BMP) kein Anstieg der ALP-Aktivität zu verzeichnen ist. Somit scheint die Wirkung von BMP auf die Fibroblasten zu so frühen Zeitpunkten durch die Messung der ALP-Aktivität nicht quantifizierbar zu sein.

Zum anderen könnte jedoch die Co-Kultur der Osteoblasten und Fibroblasten einen Einfluss auf die ALP-Aktivität haben. Dieser Effekt wurde bereits von Wang et al. beschrieben. Diese Arbeitsgruppe untersuchte das Verhalten von Fibroblasten und Osteoblasten in einem Co-Kultur Modell. Sie kamen zu dem Schluss, dass durch Co-Kultur der beiden Zelllinien die ALP-Aktivität der Osteoblasten gehemmt und zugleich das Mineralisationspotential der Fibroblasten gesteigert wird. (73) Auch Ogiso et al. haben einen ähnlichen Effekt beschrieben. Sie fanden heraus, dass Fibroblasten in Co-Kultur mit Osteoblasten die Knochen-Nodule (Zellhaufen) Bildung stark hemmen. (48)

DISKUSSION

Auch Kombinationen beider Erklärungsmuster sind denkbar und müssten durch genauere Untersuchungen bestätigt werden. Es lässt sich, unabhängig davon, jedoch feststellen, dass die ALP-Aktivität durch die BMP-2 Applikation auch in der Mischkultur stärker zunimmt als in der direkten Kontrollgruppe (Gruppe 5). Zwar kann man diese in vitro Beobachtung nicht ohne weiteres auf die Realität (Einwachsen der Sehne im Bohrkanal) übertragen, sie geben jedoch einen starken Verdacht auf das Potential des Bone Morphogenetic Proteins.

In Abbildung 35 ist die Zunahme der ALP Aktivität in den Fibroblasten Gruppen gesondert dargestellt. Ein Effekt des BMPs kann auch hier aufgezeigt werden, jedoch tritt dieser erst 8 Tage nach erstmaliger Applikation auf. Auch hierfür könnten mehrere Ursachen verantwortlich sein.

Zum einen könnten die Fibroblasten, veranlasst durch die BMP-Applikation, beginnen alkalische Phosphatase in höheren Mengen zu produzieren. Dieser Effekt ist auch mit unseren Beobachtungen aus der Histologie vereinbar (Abb. 29). Es könnte somit sein, dass der Ossifikationsprozess nicht ausschließlich von „außen“, also durch die Osteoblasten im Knochen, getragen wird, sondern, dass Impulse von „innen“, also von den Fibroblasten der Sehne, zu einer Ossifikation beitragen. Bekräftigt werden unsere Vermutungen durch eine Arbeitsgruppe um Yamada et al., die in einer Zellkulturstudie die induktive Wirkung von BMP auf die EZM-Bildung bei Tendinozyten nachwies. (80) Auch Shin et al. konnten Hinweise in diesem Bereich liefern. Sie benutzten Fibroblasten als Zielzellen für einen BMP-2 Gen Transfer und erzielten hierdurch eine verstärkte Knochen Regeneration. (62)

Somit könnte der Sehne beim Einwachsverhalten in den Knochen eine größere Rolle zukommen als bisher gedacht. Diese Beobachtung würde bei kommenden in vivo Versuchen und in der Kreuzbandchirurgie im Rahmen einer möglichen BMP-Verwendung von Bedeutung sein. Man müsste zum Beispiel die Sehnen direkt mit BMP beimpfen anstatt das BMP lediglich in den Knochenkanal einzubringen. Weitere Studien sind unbedingt notwendig, um diese Behauptung zu stützen, jedoch ist durch unsere Untersuchung bereits ein Hinweis auf einen solchen Einfluss gegeben.

Eine andere Erklärung für den BMP-Effekt in Abb. 35 könnte eine BMP induzierte Umwandlung der Fibroblasten in Osteoblasten sein. Dieses Transformationspotential des BMPs wurde von einigen Arbeitsgruppen zuvor untersucht (38, 56, 79). Die Osteoblasten könnten damit verantwortlich für die Zunahme der ALP-Aktivität sein. Ein Punkt, der für diese Art der Wirkung des BMPs spricht, ist die relativ lange Zeit bis

DISKUSSION

es zu einem sichtbaren Anstieg kommt (erste BMP-Applikation am 12. Tag → Beginn des Anstiegs am 20. Tag). Auch diese These müsste durch weitere Studien bestätigt werden. Leider gibt der zu kurze Untersuchungszeitraum nur wenige Aufschlüsse über den weiteren Verlauf der ALP-Aktivität, da alle Analyte erst zum Ende der Versuchslaufzeit gemessen wurden.

Welcher Effekt des BMPs letztlich für den Anstieg der ALP verantwortlich ist, lässt sich nur durch Zusatzuntersuchungen herausfinden. Eine Kombination beider Wirkungen (fibroblasten-induzierte Ossifikation bzw. Umwandlung von Fibroblasten in Osteoblasten) ist ebenfalls denkbar. Um Klarheit in diesen Prozess zu bringen, sollten Experimente mit längeren Beobachtungszeiträumen gewählt werden. Außerdem wäre es sinnvoll, eine immunhistochemische Bestimmung der Zellen in Kultur durchzuführen um sicher zu wissen, um welche Zellarten es sich handelt.

Abbildung 36 stützt die bereits diskutierten Ergebnisse des Hauptversuchs und des Zusatzversuchs. Eine BMP-induzierte Steigerung der Osteoblastenaktivität lässt sich anhand der ALP-Aktivitäten darstellen und ist hier der Vollständigkeit halber noch einmal mit aufgeführt.

5.4 Problematiken und Verbesserungen des Versuchsaufbaus

Im Folgenden sollen Limitierungen und Probleme, die sich im Rahmen des Versuchsaufbaus ergeben haben, diskutiert werden.

Mit unserer Studie wollten wir zunächst ein in vitro-Modell entwickeln, mit dem anschließend eine breit angelegte Untersuchung zur Wirkung von BMP-2 auf verschiedene Zelllinien durchzuführen ist. Es sollten vor allem die triggernden Effekte des BMP auf den Prozess der Knochen-Sehnen-Integration beurteilt werden. Es bestand zunächst nicht der Anspruch, eine möglichst große, statistisch signifikante, Fallzahl zu untersuchen.

Durch unsere Beobachtungen sind jedoch die Grundsteine für Folgeexperimente gelegt worden. Hierfür ist es nun unbedingt notwendig, die Gruppengröße dahingehend zu erweitern, dass statistisch repräsentative Ergebnisse gemessen werden können.

Die Auswertung des Langzeitkultur Versuchs erfolgte auf verschiedene Art und Weise. Zum einen wurden Analyte aus Zelllyse und Medienüberstand bestimmt, zum anderen wurden histologische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Sehnen gemacht und analysiert.

DISKUSSION

Verbesserungsmöglichkeiten im Bereich der Analytbestimmung lassen sich zumeist im logistischen Bereich finden. Es wäre sinnvoll, bei Folgeversuchen die Analyte immer direkt zu messen, wenn die jeweilige Probe entnommen wird. So könnten eventuelle Veränderungen im Aktivitätszustand einzelner Zellpopulationen sofort erkannt und darauf entsprechend reagiert werden. Dies wäre hilfreich um bestimmte Aspekte, wie zum Beispiel den Anstieg der ALP-Aktivität der Fibroblasten-Gruppe in Abb. 35, über längere Zeiträume zu bestimmen und daher aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten.

Vorteile hätte die Direktbestimmung auch bei der Messung der Osteocalcin Konzentrationen (Abb. 19) gebracht, da OCN allgemein als ein höchst instabiler Analyt gilt. Unsere OCN-Werte hängen sicherlich teilweise mit dem Einfrier- und anschließendem Auftauvorgang bei Lagerung der Proben zusammen. Zusätzlich sollte gerade bei solch hochspezifischen Markern mindestens eine Doppelt- oder Dreifachbestimmung erfolgen, um eventuelle Ausreißer besser interpretieren zu können. Die histologische Auswertung der Ergebnisse dient der bildlichen Darstellung des Kalzifizierungsprozesses. Die verwendeten Färbemethoden (PAS, v. Kossa) eignen sich ideal um Kalkherde, EZM, Zellnodules und Zellvitalität zu überprüfen. Das einzige Problem hierbei ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen untereinander. Es wäre daher von Vorteil, wenn man exakt, in Länge und Durchmesser, standardisierte Sehnen verwenden könnte. Es sollte zusätzlich darauf geachtet werden, dass die Sehnen möglichst dünn geschnitten werden, damit die Zellvitalität über einen so langen Versuchszeitraum bis ins Zentrum der Sehne erreicht werden kann. Die Verwendung von humanen Sehnen wäre in anschließenden Untersuchungen sinnvoll, um so nah wie möglich an der Realität zu sein.

Am schwierigsten stellte sich die rasterelektronenmikroskopische Auswertung der kultivierten Sehnen dar. Die Problematik erschließt sich vor allem daher, dass bei der REM keine Schnittbilder der Sehne entstehen, sondern lediglich ein extrem kleiner Bereich der Sehnoberfläche beobachtet werden kann. Sind also kleine Kalkherde im Inneren der Sehne entstanden (Abb. 26 A), so werden sie durch die REM nicht entdeckt. Es ist nahezu unmöglich diese einzelnen Abschnitte miteinander zu vergleichen. Zwar gelingen durch die Elektronenmikroskopie eindrucksvolle Aufnahmen der Sehnoberfläche in sehr hohen Vergrößerungen, jedoch sollten solche Untersuchungen aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit in Zukunft überdacht werden.

DISKUSSION

Um die ohnehin gute Wirksamkeit des BMPs noch zu steigern, sind kleine Modifikationen für nachfolgende Versuche denkbar, die vielversprechende Effekte erzielen könnten.

Mehrere Arbeitsgruppen, wie zum Beispiel Yoshikazu et al. konnten zeigen, dass Dexamethason und BMP-2 synergistisch wirken und gemeinsam eine stärkere ALP Erhöhung erzielen, als BMP-2 alleine. (43, 78)

Andere Untersuchungen behaupten sogar, dass BMP-2 lediglich in Kombination mit Dexamethason in die Frühphase der Osteogenese eingreifen kann, weil Dexamethason die Expression von BMP-Rezeptoren erst induziert oder weil Dexamethason die Aktivität von Transkriptionsfaktoren im BMP-2 Signalweg steigert. (50)

Auch die Arbeitsgruppe um Wang et al. erzielte eine Erhöhung der BMP-2 Wirksamkeit. Sie zeigten, dass durch die Kombination von BMP-2 und FGF (fibroblast growth factor) eine Steigerung der ALP-Aktivität erreicht werden konnte. Hemmung des FGF 2 Gens hingegen, beeinflusste die BMP-2 Bildung negativ. (74)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich nachfolgende Untersuchungen auf die direkte Bestimmung der Analyte und die histologische Auswertmethode spezialisieren sollten. Der Versuchsansatz sollte hierfür in hoher, statistisch signifikanter, Fallzahl und mit möglichst exakt standardisierten Sehnen erfolgen. Zusätzliche Steigerung der BMP-Expression und Wirkung könnte ggf. durch Zugabe von FGF und/oder Dexamethason erreicht werden.

5.5 Ausblick

Unsere Untersuchungen zeigen das enorme Potential der Bone Morphogenetic Proteins. Wie bereits einige Forschungsgruppen zuvor, konnten wir die Wirkung von BMP-2 auf Osteoblasten anhand der oben beschriebenen Auswertmethoden aufzeigen. Den Effekt, den BMP auf die Fibroblasten und damit verbunden auf die Sehne in unserer Zellkultur hat, wurde bisher nur selten beschrieben. Wir vermuten, dass der Sehne beim Prozess der Knochen-Sehnen-Integration ein enormer Anteil zukommt und dass BMP in direkter Wirkung auf Fibroblasten den Prozess der Sehnenintegration vorantreibt. Dieser Aspekt der BMP-Wirkung sollte in zukünftigen Studien genauer untersucht werden. Denkbar wären Experimente, bei denen sowohl Fibroblasten als auch Osteoblasten zu Beginn des Kultivierungszeitraums markiert werden. Hierdurch könnte

DISKUSSION

man in späteren Versuchsstadien erkennen, ob die Kalzifizierungsprozesse durch die Osteoblasten am äußeren Rand der Sehne oder aber durch die Fibroblasten vom Inneren der Sehne her getragen werden.

Wünschenswert wäre es daher, unsere Untersuchungen auf einem statistisch auswertbaren Niveau unter Rücksichtnahme auf die diskutierten Verbesserungen erneut durchzuführen, um den Weg für größere in vivo-Studien zu ebnen.

6 Zusammenfassung

Verletzungen des Bandapparates zählen zu den häufigsten Sportverletzungen weltweit. Im Bereich des Kniegelenks gehört das vordere Kreuzband (VKB), mit einem Anteil von ca. 50%, zu den am öftesten rupturierten Bändern. Alleine in den USA werden jährlich über 100.000 VKB-Rupturen operativ versorgt. Die Integration des Sehnentransplantats in den Knochen stellt eine wichtige Voraussetzung für den Heilungserfolg dar und ist häufig mit Komplikationen verbunden.

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Diskussionen. Die osteoinduktiven Effekte dieser Proteine werden häufig beschrieben und sind in zahlreichen experimentellen Studien vertreten. Groß angelegte in vitro-Studien für eine Verwendung dieser Proteine im Bereich der Kreuzbandchirurgie bestehen zum aktuellen Zeitpunkt allerdings nicht.

Ziel unserer Untersuchungen war es zu zeigen, welchen Einfluss BMP-2 auf den Prozess der Knochen-Sehnen-Integration hat und inwiefern die externe Applikation von BMP-2 zu einer verbesserten Kalzifizierung von Sehnen führt.

Hierzu wurde zunächst ein in vitro-Zellkultur-Modell auf Basis einer Knochen-Stammzellkultur etabliert. Mit Hilfe dieses Modells konnten bovine Sehnen über einen Versuchszeitraum von 3 Monaten kultiviert werden. Zur Messung des Kalzifizierungsgrades wurden zum einen mikroskopische, zum anderen histologische und biochemische Analysen vorgenommen.

Unser Modell liefert ideale Bedingungen für Zellkulturuntersuchungen über einen langen Zeitraum. Mittels der etablierten Auswertmethoden lassen sich Kalzifizierungsprozesse zu unterschiedlichsten Zeitpunkten (Frühphase: biochemische Analytbestimmung, Spätphase: Histologie) analysieren. Sowohl Kultivierungszeit, als auch Populationsgröße sind beliebig erweiterbar.

In unseren Versuchen haben wir Hinweise über den triggernden Effekt von BMP-2 auf die Mineralisationsvorgänge der Sehne erhalten. BMP-2 scheint den Prozess der Knochen-Sehnen-Integration zu beschleunigen und dadurch zu verbessern. Hierbei spielt neben dem, schon häufiger beschriebenen, Einfluss von BMP-2 auf Osteoblasten, wohl auch eine direkte Wirkung auf die Gruppe der Fibroblasten eine Rolle. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht verstanden. Wir vermuten aufgrund unserer Ergebnisse, dass BMP-2 eine Ossifikation fördert, die sowohl von den Osteoblasten, als auch von den Fibroblasten getragen wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Prozess der Knochen-Sehnen-Integration könnte der Sehne somit ein bedeutender Anteil zukommen, sodass diese möglicherweise aktiv in den Knochen einwächst.

Abschließend lässt sich feststellen, dass durch unsere Untersuchungen bereits bekannte Eigenschaften des BMP-2 bestätigt wurden und zusätzlich neue Effekte im Wirkspektrum dieser Proteinklasse aufgezeigt werden konnten. Weitere Untersuchungen in den angesprochenen Bereichen sind notwendig, um das Potential von BMP-2 vollständig auszuschöpfen.

7 Abstract

Ligament ruptures are the most common sports injuries worldwide. With about 50% the ACL-rupture is the most common ligament injury of the knee joint. Currently, more than 100.000 reconstructions of the anterior cruciate ligament (ACL) are performed annually, in the USA only. The integration of the tendon graft into the bone continues to be a critical factor in ligament surgery.

Bone morphogenetic proteins are often topics in scientific publications. Their osteoinductive potential is shown in many articles and reviews. But there is yet to be any broad in vitro-studies concerning the use of BMP in ACL-surgery.

The aim of our study was to demonstrate in which extend BMP-2 has an influence on the tendon-bone-integration and to prove if external application of BMP-2 leads to a better and faster calcification of tendons.

In doing so, we established an in vitro-cell culture model based on a bone stem cell culture. With the help of this model we were able to cultivate bovine tendons for a period of 3 months. To measure calcification, the results have been analysed microscopically (scanning electron microscopy, light microscopy), as well as histologically and biochemically by determining specific analytes such as alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN).

Our cell culture model demonstrates ideal conditions for cell culture experiments over a prolonged period of time. With our analysing techniques we were able to examine the calcification process from the early stages (biochemically) and the late stages (histology). The cultivation time and the population size can be extended at will.

In our experiments we found details about the triggering effect of BMP-2 in the mineralization process. BMP-2 seems to accelerate and optimize the process of tendon-bone-integration. Besides the influence of BMP-2 on Osteoblasts, we assume, that an effect of BMP-2 on the Fibroblasts plays an important role as well. Though the definite mechanism is not completely understood.

According to our findings, we assume that BMP-2 triggers an ossification that is carried by osteoblasts and by fibroblasts as well.

Therefore the tendon could play an important role in the process of bone-tendon-integration, so that the tendon takes an active role growing into the bone.

ABSTRACT

In conclusion we can say, that we confirmed the well known effects of BMP-2 in our experiments and additionally we identified some new effects of this group of proteins. Further studies are needed to utilize the whole potential of BMP-2 in the future.

8 Literaturverzeichnis

1. **Aspenberg, P., C. Jeppsson, and A. Economides.** 2001. The bone morphogenetic proteins antagonist Noggin inhibits membranous ossification. *J Bone Miner Res* **16**:497-500.
2. **Banerjee, C., A. Javed, J. Choi, J. Green, V. Rosen, A. van Wijnen, J. Stein, J. Lian, and G. Stein.** 2001. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* **142**:4026-4039.
3. **Beynnon, B., R. Johnson, J. Abate, B. Fleming, and C. Nichols.** 2005. Treatment of anterior cruciate ligament injuries, part 2. *Am J Sports Med* **33**:1751-1767.
4. **Beynnon, B., R. Johnson, J. Abate, B. Fleming, and C. Nichols.** 2005. Treatment of anterior cruciate ligament injuries, part I. *Am J Sports Med* **33**:1579-1602.
5. **Blagojević, Z., V. Stevanović, M. Apostolović, V. Lalosević, and N. Popović.** 2006. [Differences in the rehabilitation period following two methods of anterior cruciate ligament replacement: semitendinosus/gracilis tendon vs ligamentum patellae]. *Acta Chir Jugosl* **53**:33-38.
6. **Bollen, S.** 2000. Epidemiology of knee injuries: diagnosis and triage. *Br J Sports Med* **34**:227-228.
7. **Canalis, E., A. Economides, and E. Gazzo.** 2003. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* **24**:218-235.
8. **Carrier, R., T. Ma, K. Obrietan, and K. Hoyt.** 2006. A sensitive and selective assay of neuronal degeneration in cell culture. *J Neurosci Methods* **154**:239-244.
9. **Cheng, H., W. Jiang, F. Phillips, R. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. Szatkowski, J. Park, and T. He.** 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* **85-A**:1544-1552.
10. **Daopin, S., K. A. Piez, Y. Ogawa, and D. R. Davies.** 1992. Crystal Structure of Transforming Growth Factor-132: An Unusual Fold for the Superfamily, vol. 257, Science.
11. **De Biase, P., and R. Capanna.** 2005. Clinical applications of BMPs. *Injury* **36 Suppl 3**:S43-46.
12. **Detmer, K., and A. Walker.** 2002. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* **17**:36-42.
13. **Donahue, H.** 2000. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* **26**:417-422.
14. **Ducy, P.** 2000. the family of bone morphogenetic proteins. *In* G. Karsenty (ed.), vol. 57, *Kidney International*.
15. **Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty.** 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**:1501-1504.
16. **Endres, S.** 2002. Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkzellkultur nach Exposition mit Tivanium-Abriebpartikeln.
17. **Engstrand, T., A. Daluiski, M. Bahamonde, H. Melhus, and K. Lyons.** 2000. Transient production of bone morphogenetic protein 2 by allogeneic

- transplanted transduced cells induces bone formation. *Hum Gene Ther* **11**:205-211.
18. **Ewerbeck, V.** 2006. Standardverfahren in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie. In A. Wentzensen (ed.), 3. vollständig überarbeitete Auflage ed.
19. **Freedman, K., M. D'Amato, D. Nedeff, A. Kaz, and B. J. Bach.** 2003. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a metaanalysis comparing patellar tendon and hamstring tendon autografts. *Am J Sports Med* **31**:2-11.
20. **Gazzerro, E., V. Gangji, and E. Canalis.** 1998. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* **102**:2106-2114.
21. **George, M., W. Dunn, and K. Spindler.** 2006. Current concepts review: revision anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* **34**:2026-2037.
22. **Giannoudis, P., and H. Dinopoulos.** 2010. BMPs: Options, indications, and effectiveness. *J Orthop Trauma* **24 Suppl 1**:S9-16.
23. **Giannoudis, P. V., S. Psarakis, N. K. Kanakaris, and H. C. Pape.** 2007. Biological enhancement of bone healing with Bone Morphogenetic Protein-7 at the clinical setting of pelvic girdle non-unions. *Injury* **38 Suppl 4**:S43-48.
24. **Gläser, H.** Sportunfälle - Häufigkeit, Kosten, Prävention. In T. Henke (ed.). ARAG Allgemeine Versicherungs-AG.
25. **Granjeiro, J., R. Oliveira, J. Bustos-Valenzuela, M. Sogayar, and R. Taga.** 2005. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* **38**:1463-1473.
26. **Groeneveld, E., and E. Burger.** 2000. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* **142**:9-21.
27. **Hall, B.** 2005. Bones and Cartilage, Developmental and Evolutionary Skeletal Biology.
28. **Harner, C., J. Giffin, R. Duntzman, C. Annunziata, and M. Friedman.** 2001. Evaluation and treatment of recurrent instability after anterior cruciate ligament reconstruction. *Instr Course Lect* **50**:463-474.
29. **Hashimoto, Y., G. Yoshida, H. Toyoda, and K. Takaoka.** 2007. Generation of tendon-to-bone interface "entheses" with use of recombinant BMP-2 in a rabbit model. *J Orthop Res* **25**:1415-1424.
30. **Hsu, S., R. Liang, and S. Woo.** 2010. Functional tissue engineering of ligament healing. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* **2**:12.
31. **Kannus, P.** 2000. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* **10**:312-320.
32. **Karsenty, G.** 2001. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* **142**:2731-2733.
33. **Kawabata, M., T. Imamura, and K. Miyazono.** 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**:49-61.
34. **Kersten-Thiele, P. V.** 2011. Osteogene Differenzierung von humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) in der adhärenzten Zellkultur sowie auf boviner, kollagener Knochenmatrix.
35. **Kozhevnikova, M., A. Mikaelian, and V. Starostin.** 2008. [Molecular and genetic regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*:261-271.
36. **Legrand, C., J. Bour, C. Jacob, J. Capiamont, A. Martial, A. Marc, M. Wudtke, G. Kretzmer, C. Demangel, and D. Duval.** 1992. Lactate

- dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. *J Biotechnol* **25**:231-243.
37. **Li, J., S. Yoon, and W. Hutton.** 2004. Effect of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on matrix production, other BMPs, and BMP receptors in rat intervertebral disc cells. *J Spinal Disord Tech* **17**:423-428.
 38. **Luo, Q., X. Wang, B. Yi, Z. Li, X. Wang, and C. Liang.** 2005. [The transformation of fibroblast-like cells originating from different tissue into osteoblasts]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **40**:327-330.
 39. **Lyman, S., P. Koulouvaris, S. Sherman, H. Do, L. Mandl, and R. Marx.** 2009. Epidemiology of anterior cruciate ligament reconstruction: trends, readmissions, and subsequent knee surgery. *J Bone Joint Surg Am* **91**:2321-2328.
 40. **Ma, C., S. Kawamura, X. Deng, L. Ying, J. Schneidkraut, P. Hays, and S. Rodeo.** 2007. Bone morphogenetic proteins-signaling plays a role in tendon-to-bone healing: a study of rhBMP-2 and noggin. *Am J Sports Med* **35**:597-604.
 41. **Martinek, V., C. Latterman, A. Usas, S. Abramowitch, S. Woo, F. Fu, and J. Huard.** 2002. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* **84-A**:1123-1131.
 42. **Massagué, J., and Y. Chen.** 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**:627-644.
 43. **Mikami, Y., M. Asano, M. Honda, and M. Takagi.** 2010. Bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone synergistically increase alkaline phosphatase levels through JAK/STAT signaling in C3H10T1/2 cells. *J Cell Physiol* **223**:123-133.
 44. **Miyazono, K., Y. Kamiya, and M. Morikawa.** 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* **147**:35-51.
 45. **Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura.** 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**:251-263.
 46. **Ménétrey, J., V. Duthon, T. Laumonier, and D. Fritschy.** 2008. "Biological failure" of the anterior cruciate ligament graft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **16**:224-231.
 47. **O'Brien, M.** 1997. Structure and metabolism of tendons, *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*.
 48. **Ogiso, B., F. Hughes, A. Melcher, and C. McCulloch.** 1991. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol* **146**:442-450.
 49. **Orimo, H.** 2010. The Mechanism of Mineralization and the role of ALP in health and disease, *Journal of Nippon Medical School*.
 50. **Piek, E., L. Sleumer, E. van Someren, L. Heuver, J. de Haan, I. de Grijjs, C. Gilissen, J. Hendriks, R. van Ravestein-van Os, S. Bauerschmidt, K. Decherling, and E. van Zoelen.** 2010. Osteo-transcriptomics of human mesenchymal stem cells: accelerated gene expression and osteoblast differentiation induced by vitamin D reveals c-MYC as an enhancer of BMP2-induced osteogenesis. *Bone* **46**:613-627.
 51. **Rawadi, G., B. Vayssière, F. Dunn, R. Baron, and S. Roman-Roman.** 2003. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* **18**:1842-1853.

52. **Rider, C., and B. Mulloy.** 2010. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J* **429**:1-12.
53. **Ristiniemi, J., T. Flinkkilä, P. Hyvönen, M. Lakovaara, H. Pakarinen, and P. Jalovaara.** 2007. RhBMP-7 accelerates the healing in distal tibial fractures treated by external fixation. *J Bone Joint Surg Br* **89**:265-272.
54. **Rosen, V., J. Wozney, E. Wang, P. Cordes, A. Celeste, D. McQuaid, and L. Kurtzberg.** 1989. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect Tissue Res* **20**:313-319.
55. **Ross, and M. H.** 2006. Histology, A Text And Atlas. *In* Pawlina and Wojciech (ed.), 5th Edition ed.
56. **Rutherford, R., K. Gu, P. Racenis, and P. Krebsbach.** 2003. Early events: the in vitro conversion of BMP transduced fibroblasts to chondroblasts. *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**:117-123.
57. **Ryoo, H., M. Lee, and Y. Kim.** 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* **366**:51-57.
58. **Sampath, T., and A. Reddi.** 1981. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:7599-7603.
59. **Sampson, S., E. Bucris, M. Horovitz-Fried, A. Parnas, S. Kahana, G. Abitbol, M. Chetboun, T. Rosenzweig, C. Brodie, and S. Frankel.** 2010. Insulin increases H₂O₂-induced pancreatic beta cell death. *Apoptosis*.
60. **Scheufler, C., W. Sebald, and M. Hülsmeier.** 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* **287**:103-115.
61. **Senn.** 1889. On the Healing of Aseptic Bone Cavities by Implantation of Antiseptic Decalcified Bone. *Ann Surg* **10**:352-368.
62. **Shin, J., K. Kim, S. Kim, K. Koo, T. Kim, Y. Seol, Y. Ku, I. Rhyu, C. Chung, and Y. Lee.** 2010. Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using gingival fibroblasts promotes bone regeneration in rats. *J Clin Periodontol* **37**:305-311.
63. **Sieber, C., J. Kopf, C. Hiepen, and P. Knaus.** 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**:343-355.
64. **Silva, A., R. Sampaio, and E. Pinto.** 2010. Femoral tunnel enlargement after anatomic ACL reconstruction: a biological problem? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*
65. **Streich, N. A., D. Zimmermann, G. Bode, and H. Schmitt.** 2011. Reconstructive versus non-reconstructive treatment of anterior cruciate ligament insufficiency. A retrospective matched-pair long-term follow-up. *Int Orthop* **35**:607-613.
66. **Strobel, M.** 1998. *Arthroskopische Chirurgie*. Springer Verlag.
67. **Termaat, M., F. Den Boer, F. Bakker, P. Patka, and H. Haarman.** 2005. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* **87**:1367-1378.
68. **Thawani, J., A. Wang, K. Than, C. Lin, F. La Marca, and P. Park.** 2010. Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. *Neurosurgery* **66**:233-246; discussion 246.
69. **Urist, M.** 2002. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res*:4-10.

70. **Urist, M., and B. Strates.** 2009. The classic: Bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* **467**:3051-3062.
71. **van Bezooijen, R., B. Roelen, A. Visser, L. van der Wee-Pals, E. de Wilt, M. Karperien, H. Hamersma, S. Papapoulos, P. ten Dijke, and C. Löwik.** 2004. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* **199**:805-814.
72. **Waite, K., and C. Eng.** 2003. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* **4**:763-773.
73. **Wang, L., J. Shan, R. Choi, S. Oh, C. Kepler, F. Chen, and H. Lu.** 2007. Role of osteoblast-fibroblast interactions in the formation of the ligament-to-bone interface. *J Orthop Res* **25**:1609-1620.
74. **Wang, L., Y. Huang, K. Pan, X. Jiang, and C. Liu.** 2010. Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation. *Ann Biomed Eng* **38**:77-87.
75. **Weindl, N.** 2005. Proteoglykane und Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix der Zahnpulpa des Menschen.
76. **Welsch, U.** 2006. Welsch, Lehrbuch Histologie, 2. Auflage ed.
77. **Westerhuis, R., R. van Bezooijen, and P. Kloen.** 2005. Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. *Injury* **36**:1405-1412.
78. **Xu, L., H. Liu, D. Wang, L. E, L. Xu, Z. Jin, and Y. Duan.** 2009. Effects of BMP-2 and dexamethasone on osteogenic differentiation of rat dental follicle progenitor cells seeded on three-dimensional beta-TCP. *Biomed Mater* **4**:065010.
79. **Yabu, M., K. Takaoka, J. Hashimoto, and H. Fujita.** 1992. Immunohistochemical, autoradiographic and electron microscopic studies on the transformation of fibroblasts into chondrocytes in the mouse subfascia induced by bone morphogenetic protein. *Histochemistry* **97**:463-468.
80. **Yamada, M., K. Akeda, K. Asanuma, E. Thonar, H. An, A. Uchida, and K. Masuda.** 2008. Effect of osteogenic protein-1 on the matrix metabolism of bovine tendon cells. *J Orthop Res* **26**:42-48.
81. **Yamaguchi, A., T. Katagiri, T. Ikeda, J. Wozney, V. Rosen, E. Wang, A. Kahn, T. Suda, and S. Yoshiki.** 1991. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* **113**:681-687.
82. **Yang, C., L. Yang, M. Wan, and X. Cao.** 2010. Generation of a mouse model with expression of bone morphogenetic protein type II receptor lacking the cytoplasmic domain in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1192**:286-291.
83. **Yu, Y., J. Bliss, W. Bruce, and W. Walsh.** 2007. Bone morphogenetic proteins and Smad expression in ovine tendon-bone healing. *Arthroscopy* **23**:205-210.
84. **Yu, Y., S. Lieu, C. Lu, and C. Colnot.** 2010. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* **47**:65-73.
85. **Yuehwei, A.** 2003. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. *In* K. Martin (ed.), Humana Press.
86. **Zhang, R., Y. An, C. A. Toth, R. A. Draughn, N. M. Dimaano, and M. V. Hawkins.** 2004. Osteogenic protein-1 enhances osseointegration of titanium implants coated with peri-apatite in rabbit femoral defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **71**:408-413.
87. **Zhu, W., J. Kim, C. Cheng, B. Rawlins, O. Boachie-Adjei, R. Crystal, and C. Hidaka.** 2006. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone* **39**:61-71.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung von Knieverletzungen.....	6
Abbildung 2: mögliche postoperative Problematiken nach Kreuzbandplastik	9
Abbildung 3:Klassifikation der verschiedenen Bone Morphogenetic Proteins	12
Abbildung 4: BMP2 Struktur	13
Abbildung 5: Bindung von BMP 2 an Rezeptor.....	14
Abbildung 6: TGF- β Signalweg via SMADs	15
Abbildung 7: BMP Antagonisten	16
Abbildung 8: Funktionen der Bone Morphogenetic Proteins	17
Abbildung 9: Darstellung des Sehnenaufbaus.....	20
Abbildung 10: Übersicht des Versuchsaufbaus.....	34
Abbildung 11: bovine Sehne fixiert in Lumox Zellkulturschale.....	37
Abbildung 12: Versorgung der Sehnen mit BGJ Medium.....	38
Abbildung 13: van Kossa Färbung eines Sehnenabschnitts (20x Vergrößerung)	44
Abbildung 14: Alcianblau PAS Färbung eines Sehnenabschnitts (10x Vergrößerung).46	
Abbildung 15: REM Aufnahme einer Sehne im Querschnitt.....	47
Abbildung 16: ALP Aktivitätsvergleich zwischen Gruppe 1 und 2, signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)	50
Abbildung 17: ALP Aktivitätsvergleich zwischen Gruppe 1 und 2, signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)	51
Abbildung 18: ALP Aktivitätsvergleich aller Gruppen (1-4)	52
Abbildung 19: OCN Konzentrationsvergleich aller Gruppen (1-4).....	54
Abbildung 20: LDH Konzentrationsvergleich aller Gruppen (1-4), signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern)	56
Abbildung 21: Laktat Konzentrationsvergleich aller Gruppen (1-4).....	58
Abbildung 22: ALP Aktivitätsvergleich der Zelllyse (Gruppen 1 und 2).....	60
Abbildung 23: ALP Aktivitätsvergleich der Zelllyse (Gruppen 3 und 4).....	61
Abbildung 24: Histologie: Vergleich je einer Sehne der Gruppen 1-4 nach 4 Wochen Kultivierung (Kossa Färbung, 10x Vergrößerung).....	62

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 25: Histologie: Vergleich je einer Sehne der Gruppen 1-4 nach 8 Wochen Kultivierung (Kossa Färbung, 10x Vergrößerung).....	64
Abbildung 26: Histologie: Vergleich je einer Sehne der Gruppen 1-4 nach 12 Wochen Kultivierung (Kossa Färbung, 10x Vergrößerung).....	65
Abbildung 27: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 1 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten.....	67
Abbildung 28: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 2 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten.....	69
Abbildung 29: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 3 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten.....	71
Abbildung 30: Histologie: Vergleich der Sehnen aus Gruppe 4 zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten.....	73
Abbildung 31: REM: Aufnahmen einer Sehne aus Gruppe 1 (POB+BMP-2) nach 4 Wochen in Kultur	75
Abbildung 32: REM: Aufnahmen einer Sehne aus Gruppe 1 (POB+BMP-2) nach 8 Wochen in Kultur	76
Abbildung 33: REM: Aufnahmen einer Sehne aus Gruppe 1 (POB+BMP-2) nach 12 Wochen in Kultur	77
Abbildung 34: Zusatzversuch: ALP Aktivitätsvergleich der Gruppen 1-6 (Analyte aus Lyse), signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern).....	78
Abbildung 35: Zusatzversuch: ALP Konzentrationsvergleich der Gruppen 3 und 4 (Analyte aus Lyse), signifikante Konzentrationsänderungen $p < 0,05$ (Stern).....	79
Abbildung 36: Zusatzversuch: ALP Konzentrationsvergleich der Gruppen 1 und 2 (Analyte aus Medienüberstand).....	81

10 Abkürzungsverzeichnis

- Abb → Abbildung
- ALP → alkalische Phosphatase
- BMP → bone morphogenetic protein
- CPK → critical point Kammer
- EZM → extrazelluläre Matrix
- FCS → fetales Kälberserum
- FGF → fibroblast growth factor
- kD → Kilodalton
- LDH → Laktatdehydrogenase
- NCP → non collagenous protein
- OCN → Osteocalcin
- POB → primäre Osteoblasten
- REM → Rasterelektronenmikroskopie
- rER → raues endoplasmatisches Retikulum
- TGF → transforming growth factor
- VKB → vorderes Kreuzband

11 Anhang

11.1 Lebenslauf

P E R S Ö N L I C H E D A T E N

Name: Moritz Crönlein
Geburtsdatum: 20.12.1984
Geburtsort: Darmstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

U N I V E R S I T Ä T / Z I V I L D I E N S T / S C H U L E

U N I V E R S I T Ä T

10/2005 – 11/2011 Humanmedizin (Staatsexamen)
Philipps Universität Marburg
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum) 2007
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2011

Z I V I L D I E N S T

08/2004 – 06/2005 Zivildienst im Bezirkskrankenhaus Haar

S C H U L E

09/1995 - 06/2004 Allgemeine Hochschulreife (2004) (Abschluss: 1,8)
Gymnasium Vaterstetten, Vaterstetten (bei München)
09/1991 – 07/1995 Grundschule Baldham

P R A K T I S C H E S J A H R / F A M U L A T U R E N

P R A K T I S C H E S J A H R

03/2011 – 07/2011 Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum, Berlin
Fachgebiet: Orthopädie
Leiter: Prof. Dr. Kienapfel

ANHANG

12/2010 – 03/2011	Kantonspital Winterthur (Universität Zürich), Schweiz Fachgebiet: Chirurgie Leiter: Prof. Dr. Decurtins
08/2010 – 12/2010	Tygerberg Hospital (University of Stellenbosch), Südafrika Fachgebiet: Innere Medizin Leiter: Prof. Dr. van Rensburg

F A M U L A T U R E N

03/2010 – 04/2010	Praxis Dr. med. Friedrich Scheibe, Ilsede Allgemeinmedizin
08/2009 – 09/2009	Universitätsklinikum Marburg Klinik für Orthopädie und Rheumatologie Leiter: Prof. Dr. med. Fuchs-Winkelmann
03/2009 – 04/2009	Taranaki Base Hospital, New Plymouth (Neuseeland) Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin Leiter: Dr. D.C. Brown
02/2008 – 03/2008	Kreisklinik Ebersberg Abteilung für Unfallchirurgie/Orthopädie/Sportmedizin Leiter: Dr. med. Klaiber

S P R A C H E N U N D E D V

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Latein	
EDV	Microsoft Office, SPSS, EndNote

11.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Gerhard Aumüller
Prof. Dr. Peter Barth
Prof. Dr. Detlef Bartsch
Prof. Dr. Erika Baum
Prof. Dr. Thomas Behr
Prof. Dr. Roswitha Berger
Prof. Dr. Siegfried Bien
Prof. Dr. Frank Czubayko
Prof. Dr. Jürgen Daut
Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic
Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann
Prof. Dr. Christian Görg
Prof. Dr. Michael Hertl
Prof. Dr. Rainer Hofmann
Prof. Dr. Joachim Hoyer
Prof. Dr. Volker Klingmüller
Prof. Dr. Klaus Jochen Klose
Prof. Dr. Jan Koolman
Prof. Dr. Roland Lill
Prof. Dr. Michael Lohoff
Prof. Dr. Rolf Felix Maier
Prof. Dr. Bernhard Maisch
Prof. Dr. Roland Moll
Prof. Dr. Rainer Moosdorf
Prof. Dr. Ulrich Müller
Prof. Dr. Wolfgang Hermann Oertel
Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher
Prof. Dr. Harald Renz
Prof. Dr. Gerd Richter
Prof. Dr. Frank Rose

Prof. Dr. Matthias Rothmund

Prof. Dr. Steffen Ruchholtz

Prof. Dr. Helmut Schäfer

Prof. Dr. Stephan Schmidt

Prof. Dr. Andreas Sesterhenn

Prof. Dr. Walter Sekundo

Prof. Dr. Afshin Teymoortash

Prof. Dr. Claus Vogelmeier

Prof. Dr. Uwe Wagner

Prof. Dr. Eberhard Weihe

Prof. Dr. Jochen Werner

Prof. Dr. Hin

11.3 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst dem Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz für die hervorragende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Durch eine frühe Integration in das Team der Unfallchirurgie Marburg wurde die teilweise doch realtiv eintönige Laborarbeit zu einer sehr angenehmen Zeit, die ich nicht missen möchte.

Des Weiteren danke ich besonders meinem Doktorvater Oberarzt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas M. Frangen für die Hilfestellungen und Korrekturen während der Erstellung meiner Dissertation. Besonders möchte ich mich für die direkte Betreuung bedanken, die es erst ermöglicht hat diese Arbeit fertigzustellen.

Bei Oberarzt Herrn Dr. med. Ewgeni Ziring möchte ich mich ebenfalls für die Überlassung des Themas und die Betreuung in den letzten 4 Jahren bedanken. Ohne den ständigen Austausch untereinander und die konstruktiven Gespräche wäre solch eine experimentelle Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch herzlich bei der leitenden Technischen Assistentin Frau Marita Kratz bedanken. Ihrer Erfahrung und ständigen Hilfestellungen haben das gesamte Team und ich es zu verdanken, dass solche Projekte von der Theorie in die Praxis umgesetzt werden können. Sie führte mich in die Labortätigkeit ein und unterstützte mich in jeglicher Hinsicht.

Ich danke der Firma Medtronic® für die Bereitstellung des BMP-2, denn ohne externe Förderer wären Projekte in diesem Rahmen nicht durchführbar.

Meinem Mitdoktoranden und Freund Marius Ambrock gilt ebenfalls mein besonderer Dank. Durch die unterschiedliche Herangehensweise an verschiedene Probleme konnten wir uns stets gegenseitig Hilfestellung leisten. Die häufig stundenlangen Laborarbeiten waren gemeinsam leichter zu ertragen und stets sehr lustig.

Natürlich gilt meinen gesamten Studienfreunden in Marburg mein Dank für das schöne Studentenleben in den letzten 6 Jahren.

ANHANG

Ich danke meinem langjähriger Freund Thomas Kolben aus München, der mir stets mit wertvollen Ratschlägen und Durchhalteparolen zur Seite stand.

Bei meiner Freundin Mareile Menninger möchte ich mich ebenfalls für die unglaubliche Unterstützung bedanken und mich zugleich für meine teilweise schlechte Laune entschuldigen.

Zuletzt gebührt mein besonderer Dank meiner gesamten Familie. Nur durch die Unterstützung meiner Eltern und meiner Oma konnte mir das Studium ermöglicht werden. Die ständigen Hochs und Tiefs während der Erstellung dieser Arbeit durchlebten sie mit mir und standen mir an allen Ecken und Enden zur Seite. Danke Cathrin, Mama, Papa und Oma.

11.4 ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„IN VITRO ZELLKULTUR STUDIE ÜBER DIE SIGNIFIKANZ VON BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 (BMP-2) IM PROZESS DER KNOCHEN-SEHNEN-INTEGRATION“

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ruchholtz mit Unterstützung durch Herrn Priv-Doz. Dr. med. Thomas M. Frangen und Herrn Dr. med. Ewgeni Ziring ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum, Unterschrift